



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**A IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. E *DIROFILARIA IMMITIS* EM
GATOS NA REGIÃO DE OLHÃO**

CLÁUDIA PATRÍCIA GONÇALVES DOS RAMOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

VOGAIS:

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Ana Mafalda G. X. Félix Lourenço Martins
Doutora Carla Alexandra Soares Maia

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda G. X. Félix
Lourenço Martins.

CO-ORIENTADOR

Doutora Carla Alexandra Soares
Maia

2012

LISBOA



Com o apoio e financiamento de:





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**A IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. E *DIROFILARIA IMMITIS* EM
GATOS NA REGIÃO DE OLHÃO**

CLÁUDIA PATRÍCIA GONÇALVES DOS RAMOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

VOGAIS:

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Ana Mafalda G. X. Félix Lourenço Martins
Doutora Carla Alexandra Soares Maia

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda G. X. Félix
Lourenço Martins

CO-ORIENTADOR

Doutora Carla Alexandra Soares
Maia

2012

LISBOA

A ti “Violeta”,
metade da promessa fica assim cumprida.
A outra parte... espero cumpri-la em breve.

Aos meus pais,
pelos inúmeros sacrifícios feitos
e por me proporcionarem e alimentarem este meu sonho.

AGRADECIMENTOS

O culminar desta etapa só foi possível graças ao apoio das várias pessoas que foram cruzando o meu caminho. Pessoas únicas, que cada uma à sua maneira, me ajudaram a crescer. Refiro-me pois, àqueles que amo, que admiro, que respeito, ou que simplesmente conheço. Para eles...

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso.”

Antoine de Saint-Exupéry

Já que é de agradecimentos que trata este texto, em primeiro lugar quero mencionar toda a minha família, por todo o apoio e por terem acreditado em mim, mesmo quando eu própria duvidei, pelo orgulho espelhado em cada olhar, e pela força que me transmitem e que me leva a acreditar! Aos meus pais, porque nunca é demais agradecer todo o esforço realizado; à minha irmã pela infinita paciência e parceria em “coisas estranhas”; ao meu namorado pelas “tampas” consentidas em prol do curso, mas também pelas horas de estudo acompanhado. É incrível como sabes melhor do que eu, a lista das matérias estudadas!

Às minhas colegas de curso! Cada uma com o seu diferente rumo, mas o companheirismo e a amizade, esses continuam! Sem vocês... Eu não seria a mesma “aspirante a veterinária” que sou! Corrigindo... às minhas amigas!

Às minhas “cobaias”, principalmente à Tiara, à Muranha e ao Maturaninha, pela experiência prática que me proporcionam, e que outras vezes me obrigaram a ter; e também a todos os que já partiram... por todas as aventuras que me permitiram.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Ana Mafalda Martins, por todos os ensinamentos que me transmitiu, pelo apoio e conselhos tão sábios, pelo companheirismo e dedicação ao longo do estágio e na realização desta dissertação, pelas portas que abriu, e pelo incentivo para sempre tentar alcançar um nível de excelência. À Doutora Carla Maia, por me mostrar outros horizontes e outros caminhos, pelos quais uma veterinária se pode enredar e apaixonar, mas também pelo acompanhamento e dedicação a este trabalho, principalmente na sua componente prática.

A todo o corpo clínico do Hospital Escolar, começando pelas minhas queridas recepcionistas, auxiliares, enfermeiros, colegas de estágio, professores e médicos, pelas

novas amizades, pelos conselhos e preocupações, e principalmente pelos conhecimentos transmitidos, que fizeram deste estágio, provavelmente, uma das experiências mais enriquecedoras, tanto a nível pessoal como profissional, da minha vida!

Agradeço o convite para participar no projecto "The role of domestic cats in the epidemiology of zoonotic leishmaniasis" financiado pelo Centro de Malária e outras Doenças Tropicais.

Agradeço igualmente o patrocínio e financiamento dos laboratórios IDEXX.

Não podia deixar de referir a equipa de Investigação do grupo das leishmanioses, Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), agradeço particularmente à Professora Doutora Lenea Campino, líder do grupo, à Doutora Sofia Cortes pela persistência em “dar a volta” aos contratempos do laboratório, ao Sr. “Zé” (Técnico de diagnóstico e terapêutica), José Manuel Cristóvão, por aguentar todo o mau cheiro e continuar a contribuir com a reposição do material, e pela sua sempre boa-disposição, e à Andreia Albuquerque pelos conselhos, ajudas e por ter partilhado os meus momentos de pânico!

Ao Doutor Bruno de Sousa da Unidade de Saúde Pública Internacional e de Bioestatística do IHMT, UNL pelo acompanhamento estatístico e pelos conhecimentos transmitidos.

E obviamente, a todos os médicos veterinários, proprietários e entidades que gentilmente aceitaram participar neste projecto, em proveito do desenvolvimento do conhecimento científico, e que permitiram assim a realização deste trabalho.

A todos... um enorme e sincero OBRIGADA!

“A importância da infecção por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão”

RESUMO

A leishmaniose e a dirofilariose são duas doenças parasitárias transmitidas por vectores, causadas por um protozoário, *Leishmania infantum*, e por um nemátode, *Dirofilaria immitis*, respectivamente. Apesar do cão ser o principal hospedeiro e reservatório destes parasitas, a ocorrência destas parasitoses tem sido relatada em outros animais, nomeadamente, no gato doméstico.

Embora estas parasitoses sejam doenças emergentes, bem conhecidas na população canina, são frequentemente subestimadas na população felina, muito por desconhecimento por parte dos clínicos e dos proprietários.

O objectivo deste estudo foi estimar a prevalência de *Leishmania* spp. e *D. immitis* na população felina na região de Olhão. Para o efeito, foi estudada uma amostra de duzentos e dezassete gatos (domésticos e errantes) com mais de seis meses de idade.

A prevalência de infecção por *Leishmania* spp. obtida neste estudo foi de 4,6%, e a prevalência obtida para a infecção por *Dirofilaria immitis* foi de 5,9%, documentando pela primeira vez, tanto quanto sabemos, a existência destas duas parasitoses na população felina residente no Sul de Portugal.

Este estudo vem realçar a necessidade de alertar a comunidade veterinária e os proprietários para o risco de infecção da população felina por estes dois parasitas, e a necessidade de implementação de medidas profilácticas para proteger animais e pessoas.

Palavras-chave: Infecção, *Leishmania* spp., *Dirofilaria immitis*, gato, prevalência, Olhão.

“The importance of infection by *Leishmania* spp. and *Dirofilaria immitis* in cats in the region of Olhão”

ABSTRACT

Leishmaniosis and Heartworm are vector-borne parasitic diseases the first one caused by a protozoa, *Leishmania infantum*, and the second by a nematode, *Dirofilaria immitis*. Although dog is considered the main host and reservoir host, these parasitoses have been reported in other animals, namely in the domestic cat.

Despite the fact that these emerging diseases are well known in the canine population, they are often underestimated in the feline population, likely due to the unknown on the part of clinicians and the owners.

The aim of this study was to determine the prevalence of *Leishmania* spp. and *D. immitis* in the feline population of Olhão region. For this purpose, two hundred seventeen cats (domestic and stray) over six months of age were surveyed.

The prevalence of infecção by *Leishmania* spp. obtained in this study was 4.6%, and the prevalence obtained for *Dirofilaria immitis* was 5.9%, documenting, to our knowledge, for the first time, the existence of both parasites in the feline population living in the South of Portugal.

This study emphasizes the need to alert both the veterinary community and owners for the risk of infection in the feline population by these two parasites. Consequently there is a need to implement prophylactic measures to protect animals and people.

Key words: Infection, *Leishmania* spp., *Dirofilaria immitis*, cat, prevalence, Olhão.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Gráficos	vii
Índice de Quadros	viii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Símbolos	x
Introdução.....	1
Capítulo I – Relatório de estágio	2
Breve Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio	2
1. Actividades desenvolvidas no Hospital Escolar da FMV-UTL	2
2. Actividades desenvolvidas no IHMT	9
Capítulo II – Revisão bibliográfica da leishmaniose e dirofilariose felinas	10
II. A – Leishmaniose.....	10
1. Etiologia.....	10
2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	12
3. Fisiopatologia	17
4. Epidemiologia	19
5. Importância da leishmaniose na Saúde Pública e Veterinária.....	20
6. Leishmaniose em Portugal	20
7. Leishmaniose felina (LFel).....	23
8. Diagnóstico.....	26
9. Diagnósticos diferenciais	31
10. Tratamento.....	31
11. Profilaxia	33
II. B – Dirofilariose	35
1. Etiologia.....	35
2. Ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i>	36
3. O endossimbionte <i>Wolbachia</i>	41
4. Epidemiologia	42
5. Importância da dirofilariose na Saúde Pública e Veterinária	43
6. Dirofilariose em Portugal.....	43
7. Dirofilariose Felina (DFel)	44

8. Diagnóstico.....	48
9. Diagnósticos diferenciais	55
10. Tratamento.....	56
11. Profilaxia	59
12. Perspectivas futuras para o diagnóstico, tratamento e profilaxia da DFel.....	60
Capítulo III – A importância da infecção por <i>Leishmania</i> spp. e <i>Dirofilaria immitis</i> em gatos na região de Olhão	61
Objectivos	61
Materiais e Métodos	61
1. Caracterização da área geográfica do estudo.....	61
2. População-alvo.....	63
3. Colheita e processamento do sangue periférico	63
4. Técnicas serológicas para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> e antígenos de <i>D. immitis</i>	64
5. Detecção de ADN de <i>L. infantum</i> através da técnica de reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).....	66
6. Análise Estatística	69
Resultados	69
1. Caracterização da amostra.....	69
2. Rastreio de infecção por <i>Leishmania</i> spp.	72
3. Rastreio de infecção por <i>Dirofilaria immitis</i>	77
Discussão	79
1. Rastreio de infecção por <i>Leishmania</i> spp.	80
2. Rastreio de infecção por <i>Dirofilaria immitis</i>	83
3. Limitações do estudo.....	85
Considerações finais	85
Bibliografia.....	87
Anexos	101
Anexo I – Casuística observada durante o período de estágio curricular no Hospital Escolar da FMV-UTL.....	102
Anexo II – Dados de leishmaniose felina registrados na literatura científica.	109
Anexo III – Dados de dirofilariose felina registrados na literatura científica.	115
Anexo IV – Termo de responsabilidade e certificado de autorização dos proprietários dos animais testados para a infecção por <i>Leishmania</i> spp. e <i>Dirofilaria immitis</i>	122
Anexo V – Ficha de Identificação dos animais testados para as infecções por <i>Leishmania</i> spp. e <i>Dirofilaria immitis</i> e Inquérito apresentado aos proprietários.....	123
Anexo VI – Procedimento seguido na obtenção de amostras para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. e <i>D. immitis</i>	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia dos parasitas do género <i>Leishmania</i> – observação microscópica.	11
Figura 2 – Morfologia dos insectos do género <i>Phlebotomus</i>	13
Figura 3 – Ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	15
Figura 4 – Distribuição geográfica da LV zoonótica causada por <i>L. infantum</i>	19
Figura 5 – Algumas lesões causadas por <i>Leishmania</i> spp. em gatos.	25
Figura 6 – Morfologia dos parasitas <i>D. immitis</i> na forma adulta (L5) e na primeira forma larvar (L1 ou microfilária).	36
Figura 7 – Morfologia dos insectos da Subfamília Culicinae.	37
Figura 8 – Ciclo biológico de <i>D. immitis</i>	39
Figura 9 – Comparação da distribuição geográfica da DCan na Europa em 2001 e em 2011.	43
Figura 10 – Aspectos radiográficos de gatos acometidos por dirofilariose.	51
Figura 11 – Aspecto de uma ecocardiografia de um gato fortemente infectado por <i>D. immitis</i>	53
Figura 12 – Imagem da necrópsia do gato correspondente ao ecocardiograma da Fig. 11..	54
Figura 13 – Município de Olhão.	61
Figura 14 – Ilustração das amostras.	64
Figura 15 – Ilustração do desenho seguido para cada placa de micro-titulação.....	65
Figura 16 – Execução do teste SNAP® Feline Triple®.	66
Figura 17 – Ilustração dos resultados positivos.....	66
Figura 18 – Ilustração dos principais procedimentos de extracção de ADN utilizando o Kit Citogene®.....	67
Figura 19 – Ilustração dos resultados obtidos pela técnica serológica DAT.	73
Figura 20 – Fotografia dos resultados da PCR para amplificação da β -actina felina.....	73
Figura 21 – Fotografia dos resultados da PCR para pesquisa de <i>L. infantum</i>	74
Figura 22 – Aspecto do teste SNAP® Feline Triple® depois de executado.	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência relativa das cirurgias assistidas por espécie (frequência relativa, cães: n=86; gatos: n=23).	3
Gráfico 2 – Distribuição dos casos assistidos de acordo com a área clínica (frequência relativa, n=293).	5
Gráfico 3 – Distribuição das entidades clínicas apresentadas à consulta de Dermatologia de acordo com a espécie (frequência absoluta, n=77).	7
Gráfico 4 – Distribuição dos gatos pela freguesia de proveniência (frequência relativa, n=217).	70
Gráfico 5 – Distribuição da amostra segundo a sua origem (frequência relativa, n=217).	70
Gráfico 6 – Distribuição dos gatos pela classificação etária (frequência relativa, n=217).	70
Gráfico 7 – Escala etária dos gatos de Olhão (frequência absoluta, n=52).	70

Gráfico 8 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de raça (frequência relativa, n=217).	71
Gráfico 9 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de pelagem (frequência relativa, n=217).	71
Gráfico 10 – Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (frequência relativa, n=217).	72

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease.	74
Quadro 2 – Genótipos obtidos pelas endonucleases.	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas, no que diz respeito à realização de diversos procedimentos (frequência absoluta, n=110).	5
Tabela 2 – Interpretação dos meios de diagnóstico empregues para a detecção de infecção por <i>D. immitis</i>	55
Tabela 3 – Produtos profiláticos usados na prevenção de DFel.	60
Tabela 4 – Descrição dos casos positivos para a pesquisa de infecção por <i>Leishmania</i> spp..	76
Tabela 5 – Descrição dos casos seropositivos para a infecção por <i>Dirofilaria immitis</i>	78
Tabela 6 – Descrição da casuística das intervenções cirúrgicas observadas durante o período de estágio ao serviço de Cirurgia.	102
Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas.	103
Tabela 8 – Descrição da casuística acompanhada referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas na especialidade de Dermatologia.	108
Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica.	109
Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica.	115
Tabela 11 – Constituição da mix para a PCR de β -actina Felina, concentrações e volumes.	130
Tabela 12 – Etapas da PCR de β -actina Felina.	131
Tabela 13 – Constituição da mix para a PCR de <i>Leishmania</i> , concentrações e volumes.	132
Tabela 14 – Etapas da PCR de <i>Leishmania</i>	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico
APCs – Células apresentadoras de antígenos
DAT – Teste de aglutinação directa
DCan – Dirofilariose canina
DFel – Dirofilariose felina
D. immitis – *Dirofilaria immitis*
e.g. – por exemplo (do latim “exempli gratia”)
FeLV – Vírus da Leucemia Felina
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
GIPLs – Glicoinositolfosfolípidos
Gp63 – Glutathione peroxidase
ICC – Insuficiência cardíaca congestiva
IECA – Inibidor da enzima de conversão da angiotensina
IFN-γ – Interferão gama
IgG – Imunoglobulinas G
IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IL-12 – Interleucina 12
kDNA – ADN cinetoplastideial
Kg – Quilograma
Km – Quilómetro
LC – Leishmaniose cutânea
LCan – Leishmaniose canina
LFel – Leishmaniose felina
L. infantum – *Leishmania infantum*
LPG – Lipofosfoglicano
LV – Leishmaniose visceral
L1 – Primeira fase larvar de *D. immitis*, designada por microfilária
L2 – Segunda fase larvar de *D. immitis*
L3 – Terceira fase larvar de *D. immitis*
L4 – Quarta fase larvar de *D. immitis*
L5 – Quinta fase larvar de *D. immitis*
m – Metro
MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
mg – Miligrama
min. – Minutos
mL – Mililitro
mm – Milímetro
μm – Micrómetro
NK – do inglês Natural Killer
PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP – Restrição enzimática (do inglês PCR- Restriction Fragment Length Polymorfism)
PIF – Vírus da Peritonite Infecciosa Felina
PO – “per os” – via oral
qPCR – PCR em tempo real (do inglês real time-PCR)
RA – Região Algarvia

RAD – Região do Alto Douro
RML – Região Metropolitana de Lisboa
seg. – Segundo
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida
TNF α – Factor de necrose tumoral alfa
UNL – Universidade Nova de Lisboa
UTL – Universidade Técnica de Lisboa
VIH – Vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE SÍMBOLOS

β - Beta
 α - Alfa
 γ - Gamma
 $^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius
% - Percentagem
® – Marca Registada
™ – Marca registada (do inglês, trademark)

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o número de animais de companhia tem aumentado e muitos deles usufruem de cuidados de saúde o que também tem levado ao aumento da sua longevidade. Porém, e apesar de serem considerados os melhores amigos do homem, há várias doenças infecciosas zoonóticas que podem ser transmitidas directa, ou indirectamente, por eles. Este fenómeno é muitas vezes favorecido pela proximidade física que estabelecem com os proprietários. Por outro lado, o abandono que se faz sentir nos últimos anos, resultando na existência de populações de animais errantes sem quaisquer cuidados médico-veterinários, e em estreito contacto com o meio urbano, condicionam também o aparecimento de novos reservatórios (Taylor, Coop, Liroyd & Jacobs, 2001; Otranto & Dantas-Torres, 2010).

A leishmaniose e a dirofilariose são doenças parasitárias zoonóticas transmitidas por insectos vectores, cujo principal hospedeiro é o cão. No entanto, mais recentemente, a detecção destes parasitas também em gatos domésticos veio a relançar este tópico para a luz do dia. Tornou-se evidente que são necessários estudos com o objectivo de esclarecer o papel do gato e de qual a sua importância na epidemiologia destas doenças. Neste sentido, o tema escolhido para esta dissertação dirigido à população felina deveu-se não só ao desafio da investigação em si, mas também porque, tratando-se este trabalho de um trabalho científico, permitiria aprender, aprofundar e dar a conhecer um tema ainda pouco conhecido.

O Algarve apresenta uma prevalência considerável no que se refere à leishmaniose e à dirofilariose caninas, e estudos recentes nesta região revelam valores na ordem dos 3,8% a 25,7% de prevalência para a infecção por *Leishmania infantum*, e 5,1% a 17,1% de prevalência para a infecção por *Dirofilaria immitis*, respectivamente, para animais aparentemente saudáveis, e animais com sinais clínicos compatíveis com as parasitoses (Cardoso, Mendão & Carvalho, 2012). Contudo, tanto quanto sabemos não existem ainda estudos publicados com valores indicativos da prevalência destas doenças na população felina para esta região, motivo pelo qual se escolheu estudar um dos seus concelhos.

Os resultados obtidos podem ter consequências na prática veterinária, nomeadamente, a nível da importância de sensibilizar os médicos veterinários não só para a necessidade de incluir estas duas parasitoses no diagnóstico diferencial de patologias felinas, mas também de fomentar medidas preventivas, que permitam o seu controlo e evitem a sua propagação. Este trabalho encontra-se dividido em três partes, um capítulo dedicado à redacção das principais actividades desenvolvidas durante o período em estágio, seguindo-se uma revisão bibliográfica dos temas em estudo, e um último capítulo em que é abordada a componente prática e experimental, e onde são ainda apresentadas a discussão dos resultados e as ilações subsequentes.

O estágio curricular, etapa crucial do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV), foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), na área dos Animais de Companhia, com uma duração de seis meses, compreendidos entre o dia 12 de Setembro de 2011, e o dia 30 de Março de 2012, sob a orientação da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins.

Para além do estágio curricular foi também realizado um estágio extracurricular no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), na área de Ensino e Investigação, com uma duração de três meses, compreendidos entre 16 de Abril e 16 de Julho de 2012, sob a orientação da Doutora Carla Maia, fundamental para a elaboração da presente dissertação.

Em ambas as experiências, o plano de actividades desenvolvido teve como objectivos a aquisição e aprofundamento de conhecimentos e aptidões, e o treino e aplicação prática, na área da Clínica de Pequenos Animais e na área da Investigação, das Ciências Veterinárias.

Breve Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio

1. Actividades desenvolvidas no Hospital Escolar da FMV-UTL

O hospital está localizado na Avenida da Universidade Técnica, em serviço 24 horas por dia, todos os dias do ano, com um horário normal de consultas das 9 horas às 21 horas, dando-se em seguida início ao horário de serviço de urgências. Ao sábado o horário de serviço de urgências tem início às 18 horas e ao domingo às 13 horas.

Tratando-se de um Hospital Escolar, uma das suas finalidades é promover a formação dos jovens estudantes de Medicina Veterinária, e para isso conta com uma equipa multidisciplinar, envolvendo professores, médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares, e a presença constante de alunos e estagiários.

Dos serviços prestados destacam-se as consultas de primeira opinião, as consultas de referência e as consultas de segunda opinião, estando assim ao dispor várias especialidades, como: Animais exóticos, Cardiologia, Cirurgia, Comportamento animal, Dermatologia, Doenças infecciosas, Endocrinologia, Neurologia, Oftalmologia, Oncologia e Ortopedia; incluindo vários meios de diagnóstico, desde, análises clínicas, serviços de anatomia-patológica e citologia, bacteriologia, imagiologia (Ecografia, Endoscopia, RX, TAC), e parasitologia. Destaca-se ainda a unidade de internamento em exercício durante todo o ano.

Para fins práticos, o estagiário neste hospital é subdividido pelas áreas de Cirurgia, Consultas Externas, Imagiologia e Internamento, segundo um horário de rotatividade semanal entre o turno das 9 horas às 17 horas, e o turno das 13 horas às 21 horas. As excepções prendem-se com a área de Cirurgia, cujo horário de funcionamento é, preferencialmente, o primeiro turno, para funcionamento concomitante com as aulas práticas

de Patologia e Clínica Cirúrgica do 4.º ano; e a área de Internamento, cujo horário é formulado para bancos de 24 horas, incluindo não só os dias de semana, mas também fins-de-semana e feriados, de acordo com o plano de rotação.

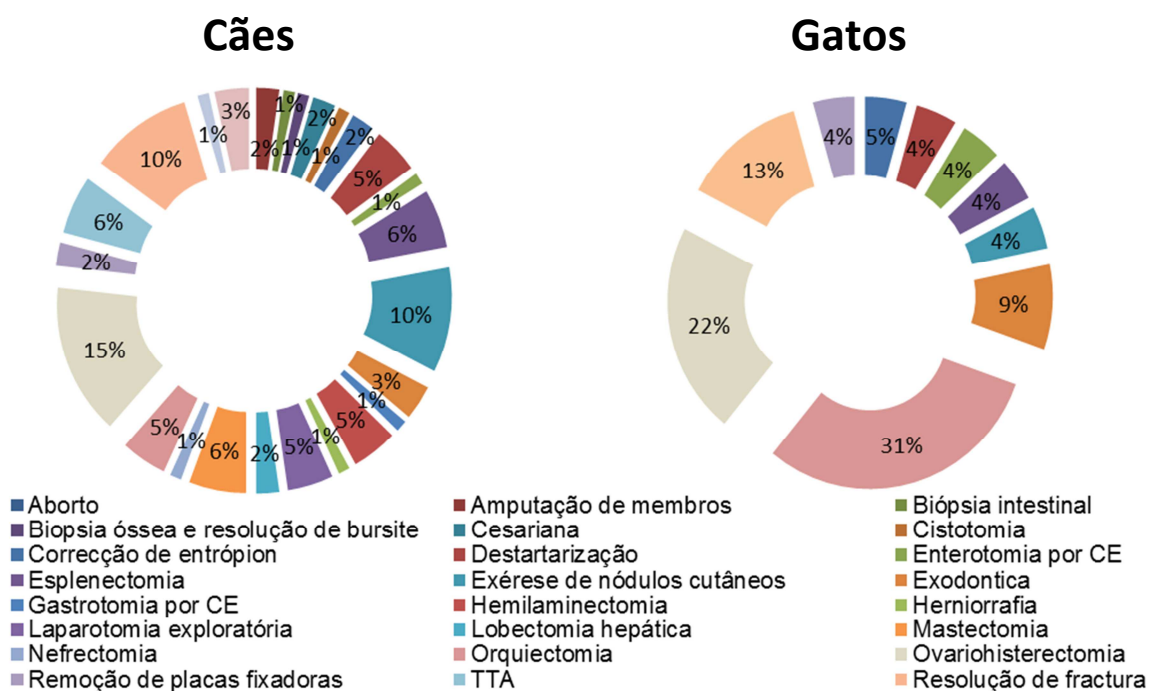
Todas as actividades realizadas são supervisionadas pelos clínicos da área em questão, e aos estagiários cabem também as funções de integração, esclarecimento e supervisão dos alunos do 3.º, 4.º e 5.º ano do MIMV.

A. Cirurgia

No período de estágio em cirurgia, correspondente a um total de 4 semanas, a estagiária realizou tarefas no período pré-operatório (recepção dos pacientes, preparação e administração de medicação pré-cirúrgica, indução anestésica, tricotomia, lavagem e desinfecção do campo cirúrgico), no período operatório (desempenhou funções como anestesista, circulante e ajudante de cirurgião/instrumentista, e até mesmo como cirurgiã em orquiectomias), e no período pós-operatório (assistência de consultas de seguimento pós-operatório, nomeadamente, observação de suturas e processo de cicatrização, realização de pensos e remoção de pontos).

Durante estas semanas apenas foram observadas cirurgias na espécie canina e felina, cuja distribuição por tipo de intervenção se encontra ilustrada de seguida, no Gráfico 1 e, também na Tabela 6 do Anexo I.

Gráfico 1 – Frequência relativa das cirurgias assistidas por espécie (frequência relativa, cães: n=86; gatos: n=23).



Observando as frequências relativas é possível verificar que a cirurgia com maior frequência relativa na espécie canina foi a Ovariohisterectomia (15%) e nos Gatos a Orquiectomia (31%).

A estagiária participou também numa formação prática desenvolvida com o objectivo de enriquecer o conhecimento acerca das técnicas cirúrgicas, destinada aos alunos estagiários em cirurgia, dirigida pela Dra. Ana Murta.

B. Consultas Externas

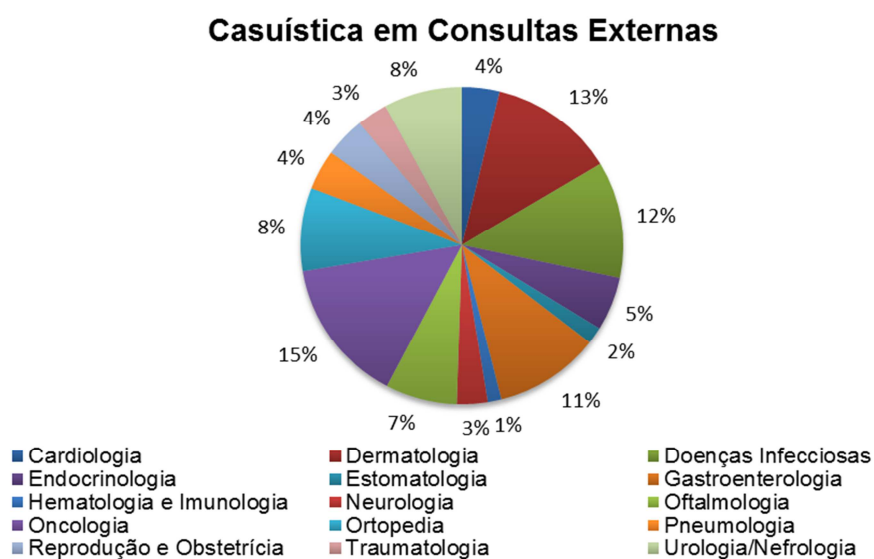
O tempo total estabelecido para o acompanhamento dos vários clínicos ao serviço da Medicina Interna neste hospital foi de 18 semanas, acompanhando a estagiária um total de 403 casos, não contabilizando as consultas de seguimento (Gráfico 2 e Tabela 1, e Anexo I:Tabela 7).

Nesta área compete à estagiária auxiliar na triagem hospitalar, receber os pacientes, identificar-se e dar a conhecer o procedimento no Hospital Escolar, dar início às consultas pela aquisição de uma boa anamnese e realização do exame físico aos animais. Esta conduta é fundamental para que um estagiário desenvolva capacidades de comunicação e interacção com os proprietários.

Em seguida, depois de uma breve discussão com o clínico acerca do caso em questão e da reavaliação do paciente por parte deste, a estagiária realizou tarefas no que diz respeito às técnicas de contenção dos animais, colaboração na realização dos meios complementares de diagnóstico, e na administração de fármacos, vacinas, (...), consoante o caso. No que diz respeito aos meios complementares de diagnóstico, a estagiária participou na recolha, preparação e envio de amostras para análise laboratorial, ou para observação no momento, ao microscópio, na realização de testes rápidos de diagnóstico, e na utilização de meios de diagnóstico imagiológico, quando necessários.

Dado o especial interesse da estagiária pela área da medicina Interna, a casuística acompanhada será então apresentada sob a forma de um gráfico de frequências relativas (Gráfico 2) e uma tabela onde se agruparam os diversos procedimentos realizados (Tabela 2).

Gráfico 2 – Distribuição dos casos assistidos de acordo com a área clínica (frequência relativa, n=293).



Pela análise do gráfico, a Oncologia foi a área clínica em que a estagiária acompanhou o maior número de casos (15%), realçando que logo em seguida se encontram casos dermatológicos (13%) e, em terceiro lugar, surgem os casos de Doenças Infecciosas (12%).

Tabela 1 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas, no que diz respeito à realização de diversos procedimentos (frequência absoluta, n=110).

Procedimentos Diversos	Espécie	N.º de casos
"Check-up" anual	Cães	3
	Gato	1
Eutanásia	Cães	5
	Gatos	3
Imunoterapia	Cães	9
Limpeza de feridas	Cães	4
	Gatos	2
Penso	Cães	8
	Gatos	5
	Sáurio	1
Protocolos de quimioterapia	Cães	9
Remoção de pontos	Cães	2
	Gatos	2
Resolução de otohematoma	Cães	2
Sutura de Lacerações	Cães	2
Teste de estimulação de ACTH	Cães	5
Vacinações	Cães	41
	Gatos	6
Total		110

Dos vários procedimentos realizados, as consultas de vacinação foram aquelas que se realizaram em maior número, realizando a estagiária um total de 47 vacinações (41 em cães e 6 em gatos).

Atendendo ainda a uma preferência muito própria pela área de Dermatologia, a estagiária optou pelo acompanhamento das consultas desta especialidade levadas a cabo pela Prof.^a Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins, nos dias em que estas decorriam e, caso estivesse escalonada para área de Consultas Externas (Gráfico 3 e Anexo I: Tabela 8).

Deste modo, acompanhando uma vasta gama de entidades clínicas dermatológicas, a estagiária adquiriu competências na realização de uma anamnese e exames dermatológicos detalhados, saberes práticos nos principais exames complementares de diagnóstico e tratamentos inerentes a esta especialidade.

A entidade clínica que se apresentou com maior número de casos foi a Dermatite atópica, tanto em cães como em gatos (26 e 6 números de casos, respectivamente).

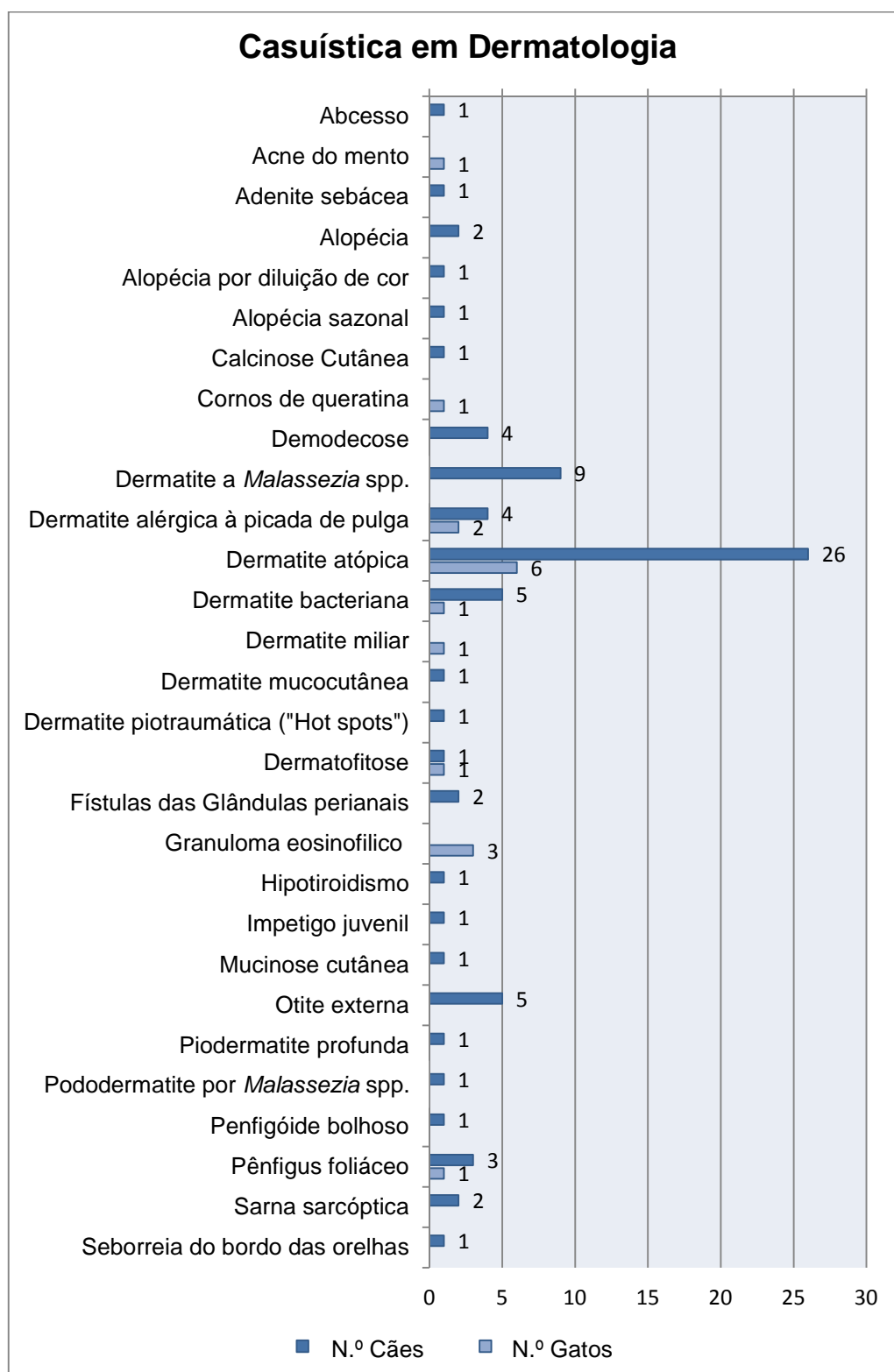
Para além das consultas de referência e seguimento em Dermatologia, surgiu em Outubro de 2011 um serviço adicional nesta área, a realização de testes intradérmicos, “vulgo” provas de alergia, com o objectivo de formular uma imunoterapia específica.

Deste modo, a estagiária assistiu e colaborou na realização de 12 provas, das quais, até ao final do estágio, 6 seguiram para a formulação de vacinas de imunoterapia.

A realização destes testes permitiu-lhe receber os pacientes, garantir que todas as condições para a realização dos mesmos haviam sido cumpridas, colocação de cateteres, realização da tranquilização, tricotomia da parede costal, inoculação dos extractos, leitura dos testes e acompanhamento do animal até à reversão completa da tranquilização.

A estagiária participou também, como assistente, em uma aula prática de “Exames Complementares em Dermatologia” integrada na disciplina de Propedêutica Médica I, aos alunos do 3.º ano do MIMV, e em uma nova disciplina opcional no MIMV “Abordagem à Dermatologia baseada na Evidência”, com o objectivo de angariar mais informação relacionada com esta área específica, onde teve ainda uma participação activa no seminário de Ferramentas de Comunicação (*Communication Skills*).

Gráfico 3 – Distribuição das entidades clínicas apresentadas à consulta de Dermatologia de acordo com a espécie (frequência absoluta, n=77).



Ainda na área das consultas externas, e dado o serviço de 24 horas permanente do hospital, foram várias as urgências que a estagiária presenciou, participando activamente, em equipa, no auxílio na primeira abordagem a doentes politraumatizados, participação em reanimações cardio-respiratórias, fluidoterapia, oxigenioterapia, entre outros procedimentos.

C. Imagiologia

A rotação estabelecida para o serviço de Imagiologia teve no total a duração de 2 semanas, englobando as áreas de radiologia, ecografia e endoscopia.

No que respeita à radiologia, coube à estagiária auxiliar no posicionamento dos animais, na realização de radiografias a tecidos moles (torácicas e abdominais) e a tecido ósseo (esqueleto axial e apendicular); participar na discussão dos dados radiográficos encontrados; e recordar conceitos, nomeadamente, no que diz respeito às constantes radiográficas. A estagiária presenciou e ajudou na realização de mielografias, nomeadamente, na preparação do paciente e como anestesista, e do mesmo modo, na realização de tomografias axiais.

Os principais casos assistidos foram de radiografias torácicas em posição latero-lateral para pesquisa de metástases e/ou avaliação da silhueta cardíaca, e radiografias latero-laterais abdominais para avaliação do sistema digestivo, aparelho reprodutor e aparelho urinário. As tomografias foram, essencialmente, para pesquisa de alterações cranianas e/ou avaliação pré-cirúrgica de massas e estruturas envolventes.

Na área da ecografia, a estagiária assistiu e auxiliou na contenção dos animais para a realização de ecografias abdominais e ecocardiografias, e também praticou a técnica ecográfica em algumas situações. Assistiu ainda à realização de alguns procedimentos ecoguiados: punção aspirativa de órgãos abdominais, biopsias hepáticas, cistocentese, abdominocentese, e pericardiocentese. A grande maioria das ecografias abdominais teve como objectivo a avaliação do sistema digestivo e aparelho reprodutor.

No que diz respeito ao âmbito da endoscopia, a estagiária observou duas endoscopias gástricas para remoção de corpos estranhos e realização de biopsias, respectivamente, para além de uma rinoscopia e, quatro vídeo-otoscopias para observação de corpos estranhos, existência de massas e/ou integridade da membrana timpânica.

D. Internamento

Os bancos de 24 horas repetiram-se rotativamente 25 vezes ao longo dos 6 meses de estágio. Durante estes turnos a estagiária foi responsável por todos os animais internados, pelos cuidados a ter com os mesmos e, pelo acompanhamento da evolução do seu estado clínico. Para além do médico veterinário responsável pelas decisões clínicas, os estagiários estão também acompanhados por auxiliares e/ou enfermeiros veterinários, bem como alunos do 3.º, 4.º e 5.º ano, todos integrados em equipa e com funções e tarefas definidas.

Apesar do desafio de um turno de 24 horas, o Internamento é uma área fundamental para o desenvolvimento de competências práticas e de raciocínio rápido. De entre as actividades desenvolvidas encontram-se: a limpeza, a alimentação, a monitorização dos parâmetros clínicos dos animais internados, e o cumprimento dos horários de passeio e da medicação prescrita. Para além disso, requerem-se também o cumprimento de alguns procedimentos

como colheita de sangue e/ou urina, colocação de cateteres endovenosos, realização de enemas, algalias e lavagens vesicais, realização de drenagens de derrames (torácicos e abdominais), realização de transfusões sanguíneas e consequentes monitorizações, realização de eutanásias, traçar curvas de glicémia, limpeza de feridas e muda pensos, proceder a sessões de fisioterapia, entre outros.

É ainda nesta divisão que se encontra uma bancada laboratorial onde a estagiária efectuou a determinação de microhematócritos, proteínas totais pelo refractómetro e, realização tiras rápidas de urina.

Com o objectivo de alargar conhecimentos e sintetizar aspectos mais relevantes, a estagiária participou em reuniões ocasionais, ao longo do estágio, sob orientação da Dra. Marisa Ferreira, em regime voluntário, discutindo alguns temas da prática clínica, casos e doenças que foram surgindo, focando os conhecimentos e progressos mais recentes.

2. Actividades desenvolvidas no IHMT

O Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) é uma instituição portuguesa de investigação e de ensino superior no domínio da medicina tropical. Está sedado em Lisboa, na Rua da Junqueira e constitui uma unidade orgânica da Universidade Nova de Lisboa.

Este Instituto tem como missão a investigação nas áreas da medicina tropical, das ciências biomédicas e da saúde internacional, e a realização de um ensino superior (especialmente no que respeita a pós-graduações, embora também sejam ministrados mestrados e cursos de curta duração). Presta ainda serviços clínicos, laboratoriais e de saúde pública à comunidade (consultas do viajante, consultas de medicina tropical e vacinação), contribui para a resolução de problemas de saúde global, especialmente nas regiões tropicais, em cooperação internacional, e na divulgação do conhecimento científico.

Na Unidade de Ensino e Investigação, um dos agentes patogénicos em destaque é o parasita causador da leishmaniose, em estudo no Projecto “The role of domestic cats in the epidemiology of zoonotic leishmaniasis” levado a cabo pela Doutora Carla Maia. A colaboração da autora neste projecto englobou o processamento das amostras e informações recolhidas na região de Olhão e o posterior trabalho laboratorial desenvolvido neste local, que permitiu a realização da componente prática desta dissertação.

O processamento das amostras e a realização das técnicas de diagnóstico laboratoriais utilizadas decorreram nos laboratórios da Unidade de Parasitologia Médica e Centro de Malária e outras Doenças Tropicais do IHMT com supervisão da Doutora Carla Maia e restantes colaboradores.

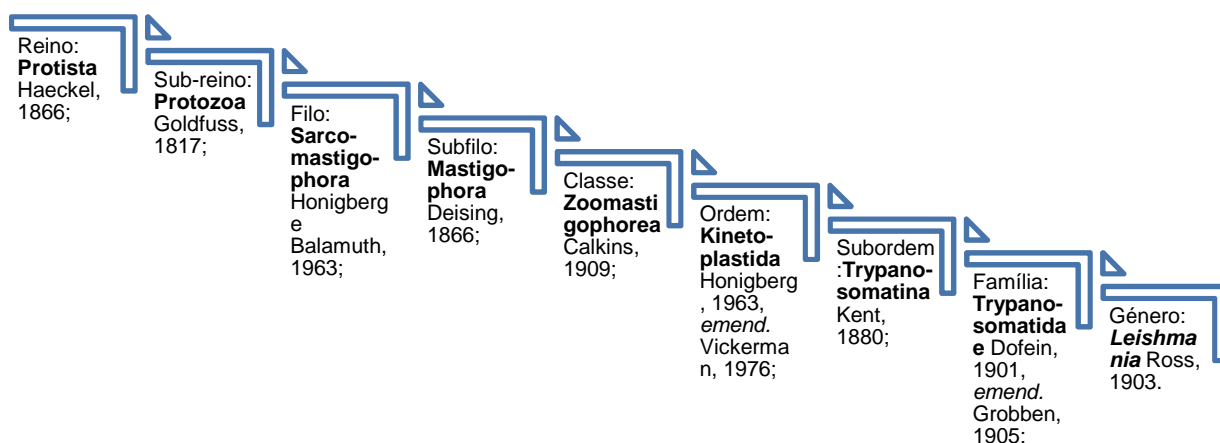
Toda a componente prática inerente ao projecto permitiu à autora aprofundar conhecimentos e desenvolver aptidões em técnicas serológicas e moleculares, no âmbito da leishmaniose e dirofilariose.

II. A – Leishmaniose

1. Etiologia

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças infecciosas parasitárias, com aspectos clínicos e epidemiológicos muito variados, sendo causadas por um protozoário intracelular obrigatório do género *Leishmania* (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2010). Estes parasitas são transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, a várias espécies de animais, incluindo seres humanos, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas dos quatro continentes, à excepção da Oceânia (OMS, 2010).

Quanto à classificação taxonómica sugerida por Basano e Camargo, 2004 (citados por Faria, 2008), o género *Leishmania* Ross, 1903 pertence ao:



O género *Leishmania* divide-se ainda no subgénero *Leishmania* e subgénero *Viannia*, e dentro destes subgéneros individualizam-se diversos complexos filogenéticos, que incluem uma ou mais espécies (OMS, 2010). A espécie *L. infantum* responsável pela leishmaniose em Portugal (Campino *et al.*, 2006) faz parte do complexo *L. donovani* (Lukes *et al.*, 2007). Contudo, e contrariamente ao que acontece com a maioria dos seres eucariontes que podem ser identificáveis e diferenciados pela sua morfologia, os parasitas do género *Leishmania* possuem uma grande homogeneidade estrutural, o que impede a identificação das espécies com base nas suas características morfológicas. Embora inicialmente, a identificação e classificação destes parasitas tenha sido baseada em critérios extrínsecos aos mesmos, tais como a sua patogénese, o tipo de hospedeiro, a distribuição geográfica e outras características epidemiológicas, actualmente, utilizam-se critérios baseados nas características intrínsecas, isto é, critérios relacionados com o genoma, que permitem a distinção de espécies e variantes dentro de cada espécie (Shaw, 1994 citado por Campino & Abranches, 2002; Gramiccia & Grandoni, 2007).

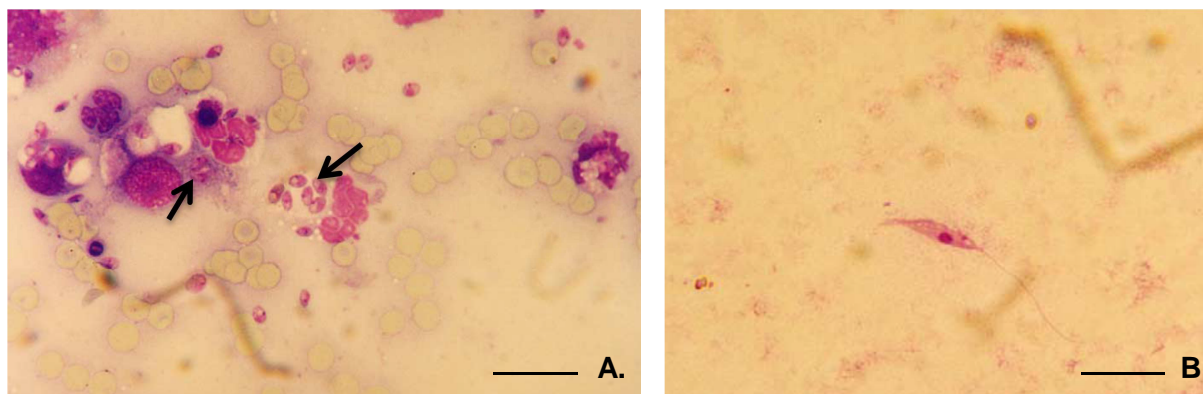
A caracterização isoenzimática começou a ser utilizada no início de 1980, e tem sido considerada como a técnica de referência (“gold standard”) na identificação das espécies de *Leishmania*, fundamentada pela mobilidade electroforética das isoenzimas dos diferentes parasitas. Assim, o conjunto de isolados com o mesmo perfil isoenzimático (zimograma) representa um zimodeme para uma dada espécie (Campino & Abranches, 2002; Gramiccia & Grandoni, 2007). O zimodeme MON-1 de *L. infantum* é considerado o principal agente etiológico da leishmaniose nos países Mediterrânicos (Campino *et al.*, 2006).

Todavia, técnicas moleculares baseadas no estudo do genoma, como a genotipagem ou sequenciação a partir do ADN do parasita, têm na última década ganhado relevo e são muitas vezes solicitadas como alternativa à caracterização isoenzimática (Gramiccia & Gradoni, 2007). Uma das técnicas utilizadas é a restrição enzimática (PCR-RFLP – “Reacção em cadeia da polimerase” – “restriction fragment length polymorphism”) que permite detectar substituições de nucleótidos ou de aminoácidos que não afectam a mobilidade electroforética das isoenzimas. Este método de tipagem é complementado pela PCR que utiliza alvos polimórficos de ADN com alto poder discriminatório permitindo a diferenciação entre estirpes de uma mesma espécie (Cortes *et al.*, 2006).

Entre as espécies de *Leishmania* conhecidas, 20 são reconhecidamente infectantes para os seres humanos, e 13 possuem natureza zoonótica no Velho e no Novo Mundo (Gramiccia & Gradoni, 2005; OMS, 2010).

Em termos morfológicos, os parasitas do género *Leishmania* são pleomórficos, e apresentam-se em duas formas distintas: forma amastigota e forma promastigota (Fig.1).

Figura 1 – Morfologia dos parasitas do género *Leishmania* – observação microscópica.



A – Formas amastigotas, intra e extracelulares, num esfregaço corado por Giemsa (setas). Barra, 30 μ m. **B** – Forma promastigota numa cultura de 5 dias, corada por Giemsa. Barra, 45 μ m. (adaptado de Souza *et al.*, 2005).

A forma amastigota é redonda ou oval com 2,5-6,8 μ m de diâmetro, encontrando-se no interior dos macrófagos e células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado. O citoplasma apresenta um núcleo arredondado, excêntrico e bem visível; um

cinetoplasto (estrutura mitocondrial) em forma de bastonete; e um envelope flagelar (blefaroplasto) que contem um flagelo rudimentar (Antoine, 1994, Bourdeau, 1983 citados por Faria, 2008; Gramiccia, 2011).

A forma promastigota, é fusiforme com cerca de 15-30 x 3 µm, extracelular e encontra-se nos vectores flebotomíneos. Esta forma é dotada de mobilidade dado o longo flagelo anterior, e nesta forma o cinetoplasto situa-se entre o núcleo e o flagelo (Gállego & Riera, 2007, citados por Faria, 2008; Gramiccia, 2011).

2. Ciclo biológico de *Leishmania*

Os parasitas do género *Leishmania* apresentam um ciclo biológico heteroxeno, uma vez que necessitam de dois hospedeiros para que o seu ciclo de vida se complete, um hospedeiro invertebrado (vector do agente patogénico) e um hospedeiro vertebrado (que abriga o agente e sofre os efeitos patogénicos).

2.1. Hospedeiro Invertebrado

Os flebotomíneos são insectos pertencentes à Ordem Diptera, à Família Psychodidae e à Subfamília Phlebotominae. Dos 13 géneros actualmente reconhecidos, dois apresentam importância em Medicina humana e veterinária, nomeadamente o género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, no Velho Mundo e o género *Lutzomyia* França, 1924, no Novo Mundo. Das centenas de espécies conhecidas, cerca de 50 espécies são vectoras de *Leishmania* spp., podendo ainda ser responsáveis pela transmissão de vários arbovírus, *Bartonella* spp., e da doença “harara” (Adler & Theodor, 1957, citados por Afonso & Alves-Pires, 2008).

Em Portugal, são conhecidas cinco espécies flebotomínicas, nomeadamente *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. perniciosus*, *P. ariasi* e *Sergentomyia minuta* (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Morfológicamente, os adultos são dípteros de reduzidas dimensões, com 2 a 5 mm de comprimento, de cor castanha, clara ou escura, profusamente revestidos por sedas. Apresentam na cabeça antenas iguais em ambos os sexos mas um aparelho bucal vulnerante na fêmea, direccionado para baixo e adaptado para a perfuração e sucção. O tórax é globoso, onde se inserem asas lanceoladas, pilosas que se mantêm erectas sobre o corpo, em repouso; e três pares de patas, sendo as posteriores muito compridas. O abdómen apresenta um dimorfismo sexual acentuado, existindo no macho um conjunto de segmentos posteriores designados por genitália que ajudam a segurar a fêmea no momento da cópula (Fig. 2) (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn, Jennings, 1996; Afonso & Alves-Pires, 2008; Afonso, 2011).

Figura 2 – Morfologia dos insectos do género *Phlebotomus*.



Legenda: o macho encontra-se representado à esquerda e a fêmea à direita (fonte:Dillon, 2012).

Apesar da sua distribuição a nível mundial, as diferentes espécies de flebótomos não se distribuem continuamente, encontrando-se entre os 50º de latitude a norte e os 40º a sul, e entre altitudes de abaixo do nível do mar e até aos 3300 metros. Quanto à sua capacidade de dispersão, também varia com a espécie e com o tipo de habitat, Killick-Kendrick *et al.*, (1984, citados por Killick-Kendrick, 1999) mostraram que *P. ariasi*, num foco em França se deslocou até uma distância de 2 km, mas outros autores com outras espécies só chegaram a resultados de aproximadamente metade desse valor (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Em relação ao ciclo de vida, os adultos apresentam uma vida aérea e as fases imaturas uma vida terrestre. As fêmeas são hematófagas e fitófagas e os machos somente fitófagos, alimentando-se de sucos vegetais ou de açúcares provenientes de plantas ou de outros insectos. As fêmeas alimentam-se de sangue de mamíferos, aves ou répteis para efectuarem as posturas dos ovos (até 100 ovos) em solos húmidos, tais como tocas de roedores, grutas, galinheiros, coelheiras, lixeiras, fissuras de muros e outros, onde se desenvolvem as larvas. Estas são saprófagas alimentando-se de matéria orgânica, animal ou vegetal, em decomposição, e apresentam diapausa nas regiões temperadas. As pupas não se alimentam até à eclosão dos adultos. A duração média do ciclo de vida (ovo a adulto) é variável em função da temperatura, humidade e do fotoperíodo, mas apresenta em média, a duração de 45 a 60 dias. Nos climas temperados o número de gerações anuais varia de um a dois. As fêmeas flebotomínicas apresentam actividade crepuscular e/ou nocturna, cessando a sua actividade abaixo dos 12°C a 16°C, e têm a capacidade de se infectarem com uma ou mais espécies de *Leishmania*, ao efectuarem uma refeição sanguínea em hospedeiros vertebrados infectados. Após o desenvolvimento do parasita no interior do aparelho digestivo da fêmea, esta torna-se infectante transmitindo as leishmanias aquando de uma nova refeição num hospedeiro vertebrado (Urquhart *et al.*, 1996; Afonso & Alves-Pires, 2008; Afonso, 2011).

De realçar que, no que diz respeito às leishmanioses, a existência de focos zoonóticos, ou antroponóticos está limitada à presença vectorial, à sua distribuição, à sua capacidade de dispersão, à sua abundância, à existência de hospedeiros vertebrados infectados e às condições climáticas e ambientais em geral. Assim, estes insectos para além de possuírem biótopos muito diversificados encontrando-se tanto no interior das habitações humanas (endófilos), como no exterior (exófilos), são os agentes focalizadores da doença (Afonso & Alves-Pires, 2008).

2.2. Hospedeiros vertebrados

Vários têm sido os hospedeiros vertebrados infectados por elementos do género *Leishmania*, ao longo dos tempos. Entre eles é possível identificar tanto espécies domésticas como silváticas.

O cão (*Canis familiaris*) é universalmente considerado o principal hospedeiro e reservatório da leishmaniose visceral (LV) humana causada por *L. infantum* (sinónimo de *L. chagasi* no Novo Mundo), no Velho e no Novo Mundo, e as razões porque o é considerado prendem-se como facto da infecção ser frequentemente detectada na população canina; pela duração da infecção sem a manifestação de sinais clínicos; pela apresentação de uma carga parasitária suficiente no tecido cutâneo e sangue periférico, aumentando a possibilidade de transmissão para o vector; pela estreita relação com os seres humanos; por apresentarem parasitas indistinguíveis dos isolados a partir de casos humanos; pelas preferências hemáticas dos vectores, que se alimentam frequentemente neles; e porque está provado que são infectantes para o vector (Quinnell & Courtenay, 2009; OMS, 2010). Além disso, em muitas áreas endémicas é possível considerar a ocorrência de dois ciclos de transmissão, doméstico/peridoméstico pelo cão, e silvestre pela raposa (*Vulpes vulpes*), que actuam simultaneamente, ligados através de um vector comum responsável pela transmissão do parasita entre os dois ciclos (Maia & Campino, 2011).

No entanto, o envolvimento de outras espécies hospedeiras na epidemiologia da leishmaniose não pode ser descurado, particularmente em zonas onde a doença é endémica. Entre os relatos sobre os hospedeiros mamíferos recém-identificados, os gatos (*Felis catus*) domésticos são recorrentemente encontrados infectados com *Leishmania* spp.. Tem sido demonstrado que estes animais podem ser infectados (embora apenas em alguns casos haja desenvolvimento da doença), tornando-se portadores de parasitas passíveis de serem transmitidos a vectores competentes. Ainda assim, o seu papel como reservatórios é controverso e a sua susceptibilidade à infecção continua a ser mal compreendida (Savani, *et al.*, 2004; Simões-Mattos *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Maia, Nunes & Campino, 2008; Nasereddin, Salant & Abdeen, 2008; Tabar *et al.*, 2008; Maia & Campino, 2011).

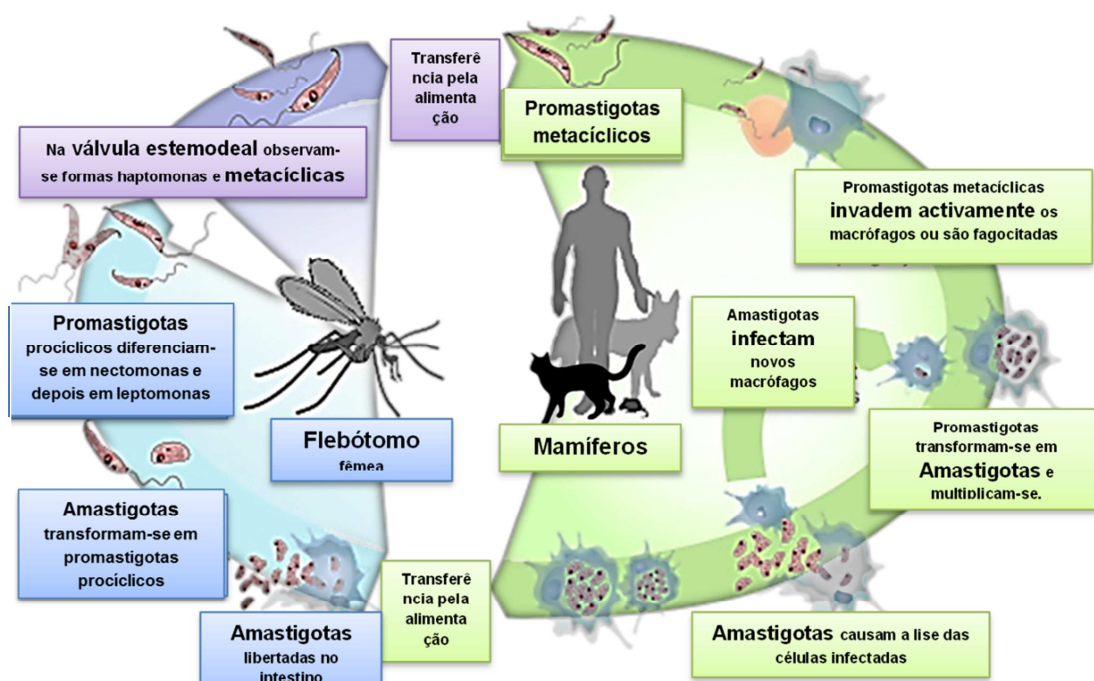
Infecções em animais de pecuária como cabras, vacas, suínos, cavalos, burros, mulas e em animais silváticos como raposas, lobos, guaxinins, ouriços-cacheiros, ratos, morcegos, texugos, ginetas, lince-ibérico, saca-rabos também têm sido referidas (Mancianti, Mignone & Galastri, 1994; Rolão, Martins, João & Campino, 2005; Gramiccia & Gradoni, 2007; Quinnell & Courtenay, 2009; Gramiccia, 2011).

O Homem é considerado o hospedeiro primário para a leishmaniose antroponótica e um hospedeiro acidental na leishmaniose zoonótica. A infecção por *L. infantum*, em humanos é considerada acidental, e a forma visceral é a manifestação clínica mais grave desta infecção, sendo observada principalmente em crianças e adultos imunocomprometidos (Gramiccia & Gradoni, 2007; OMS, 2010).

2.3. Descrição do Ciclo biológico de *Leishmania*

Figura 3 – Ciclo biológico de *L. infantum*.

(adaptado de Villarreal, 2008).



A infecção vectorial inicia-se quando uma fêmea flebotomínica ao efectuar uma refeição sanguínea ingere macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Fig.3).

O ciclo de vida do parasita, no aparelho digestivo do vector efectua-se em cerca de seis a nove dias. Nas primeiras 24 a 48 horas após a refeição, as formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas e dá-se início à primeira multiplicação parasitária intravectorial. Ao fim de 48 a 72 horas, as formas procíclicas transforma-se em formas nectomonas que migram da região posterior para a região anterior do intestino médio.

Seguidamente, em 4 a 7 dias, desenvolvem-se as formas leptomonas que sofrem a segunda multiplicação intravectorial, e na válvula estemodeal observam-se as formas haptomonas e as formas metacíclicas, em 5 a 7 dias. Estas últimas são as formas infectantes, apresentam um longo flagelo e estão adaptadas para a transmissão aos hospedeiros vertebrados; as haptomonas fixam-se à válvula estemodeal e provocam a degenerescência da mesma, permitindo às formas metacíclicas atingirem a cavidade oral e penetrarem num hospedeiro vertebrado aquando de uma nova refeição. A perda da função da válvula estemodeal (que em condições normais evita a regurgitação do sangue ingerido) e a oclusão do lúmen intestinal causada pelos parasitas dificultam a alimentação do vector (Killick-Kendrick, 1999). Este facto obriga o vector a realizar várias tentativas para realizar uma refeição sanguínea e obter a quantidade de sangue de que necessita, obrigando-o a picar vários hospedeiros. Isso parece explicar o porquê de determinados focos apresentarem uma elevada prevalência de leishmaniose apesar de uma baixa taxa de infecção flebotomínica (Afonso & Alves-Pires, 2008).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando um flebotomíneo fêmea se alimenta neste, e possui as formas metacíclicas infectantes que se libertam juntamente com a saliva (Fig.3).

As principais áreas corporais atingidas pela picada do flebótomo são zonas de menor densidade pilosa, como a trufa, as orelhas e o abdómen, provavelmente, por ser mais fácil ao insecto obter o sangue de que precisa (Killick-Kendrick, 1999).

Na epiderme do hospedeiro, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até à lise dos mesmos, ocorrendo a libertação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo (Gramiccia & Gradoni, 2007). Em alguns hospedeiros, os parasitas não ficam confinados à pele e são levados pelos macrófagos e disseminados por via linfática ou hemática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como os linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Ravel, 1995, Abranches, 1994, MSB, 2003, Gállego & Riera, 2007, citados por Faria 2008).

2.4. Formas de transmissão independentes do vector flebotomíneo

A transmissão de *Leishmana* spp. por vectores flebotomíneos é a via de transmissão mais frequente e importante, contudo outras formas de transmissão têm sido descritas.

Reconhece-se que em estados avançados e graves da leishmaniose canina (LCan), a disseminação de parasitas ocorra, para além do sangue periférico e pele, também em órgãos internos, e que os parasitas possam ser isolados na mucosa conjuntival e genital, em saliva e sémen. Assim, as transmissões venérea, vertical, por via iatrogénica pela transfusão

de sangue, ou por lutas surgem como uma possível via de transmissão em cães (Gramiccia & Gradoni, 2007; Silva *et al.*, 2009, citados por Quinnell & Courtenay, 2009).

Em humanos, para além das vias acima descritas para os Cães, devem ser também consideradas a via de disseminação pelo transplante de órgãos, e a transmissão pela partilha de seringas entre os usuários de drogas intravenosas (Campino, Santos-Gomes, Pratlong, Dedet & Abranches, 1994; Le Fichoux *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2002, Alvar *et al.*, 2008, Antinori *et al.*, 2008, citados por Quinnell & Courtenay, 2009).

As carraças *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas *Ctenocephalides felis* também poderão estar implicadas na transmissão de *Leishmania* spp. Blanc & Caminopetros (1930, citados por Quinnell & Courtenay, 2009) demonstraram pela primeira vez a infecção transtadial por *Leishmania* spp. em ixodídeos infectados experimentalmente, assim como a transmissão mecânica de parasitas para as carraças após refeição sanguínea em cães infectados, o que foi posteriormente confirmado por Coutinho *et al.* (2005). Porém a transmissão de *Leishmania* spp. por carraças ou o desenvolvimento de formas metacíclicas em ixodídeos, ainda não foram provadas. Um cenário semelhante está descrito para infecções por *Leishmania* spp. em pulgas (Coutinho & Linardi, 2007, citados por Quinnell & Courtenay, 2009; Ferreira, Fattori, Souza & Lima, 2009).

Contudo, a importância epidemiológica destas vias de transmissão independentes do vector na maioria das áreas endémicas será nula ou baixa.

3. Fisiopatologia

Para que a infecção por *Leishmania* spp. seja conseguida é necessário a existência de uma tríade que envolve o agente infeccioso, o vector e o hospedeiro.

A expressão clínica das leishmanioses depende da localização do parasita, estando directamente ligada ao tropismo da espécie em causa, assim como ao estado imunológico dos hospedeiros (Gradoni & Gramiccia, 1994, citados por Campino *et al.*, 2006).

Em condições naturais, os flebótomos transmitem entre 100 a 1000 formas promastigotas, um número capaz de induzir doença em animais susceptíveis; contudo, a maioria dos parasitas são mortos por factores do complemento do hospedeiro vertebrado, pelo que, de modo a sobreviverem, as leishmanias tiveram de desenvolver algumas estratégias. Uma vez no hospedeiro vertebrado os promastigotas aderem rapidamente a células do sistema mononuclear fagocitário e os receptores mais importantes para esta aderência são os receptores do complemento tipo I (CR1, CD35) e tipo III (CR3, CD11b/CD18) que permitem a ligação à membrana plasmática dos parasitas (Rosenthal *et al.*, 1996, citado por Faria, 2008). Esta adesão dependente do complemento é seguida pela interiorização do parasita por fagocitose. Dentro do fagolisosoma, dá-se uma queda do pH para 4,5-5, o que dificulta a sobrevivência da maioria dos parasitas, mas as leishmanias possuem várias moléculas de superfície, tais como, LPG (lipofosfoglicano), gp63 (glutathione peroxidase) e GPIs

(glicoinositolfosfolípidos), que parecem contribuir para a sua sobrevivência no meio ácido rico em proteases (Bogdan & Rollinchoff, 1998, citados por Faria, 2008).

A inoculação dos parasitas na pele provoca uma resposta inflamatória local. Numa primeira fase as células envolvidas são neutrófilos e eosinófilos, seguindo-se os macrófagos, podendo também ser detectadas células “natural killer” (NK). Os linfócitos intervêm mais tarde e, se a doença progredir, a inflamação torna-se tipicamente granulomatosa (Cotran *et al.*, 1999, citados por Faria, 2008). Em hospedeiros susceptíveis, a infecção por espécies de *Leishmania* viscerotrópicas dissemina-se rapidamente para os linfonodos, baço e medula óssea, contrariamente ao que ocorre em hospedeiros resistentes, ou infectados com estirpes dermatotrópicas, em que os parasitas se mantêm localizados na pele (ou atingem apenas os linfonodos locais). As principais células responsáveis pela contenção da infecção na pele são as NK, as quais rapidamente produzem interferão gama (IFN- γ) e a interleucina-12 (IL-12). O IFN- γ é um importante indutor da síntese de óxido nítrico (NO₂) nos macrófagos, que juntamente com a produção de superóxido (O²) são os dois mecanismos mais eficientes na eliminação dos parasitas. O estabelecimento de uma resposta imunitária protectora anti-*Leishmania* é um processo muito complexo que exige a apresentação de antígenos apropriados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), a indução e expansão dos linfócitos T “helper” (Th) Th1 CD4+, e a activação dos macrófagos para a destruição dos parasitas. As principais APCs na leishmaniose são os macrófagos, as células dendríticas e as células de Langerhans (Bogdan e Rollinchoff, 1998, Belkaid, 2000, Solbach e Laskay, 2000, citados por Faria, 2008).

Nos cães, quando ocorre imunidade mediada por células T CD4+ com libertação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , há indução da actividade protectora anti-*Leishmania* pelos macrófagos e a infecção pode ser subclínica. Por sua vez, em animais em que se desenvolve uma forte resposta humoral não-protectora associada a uma fraca imunidade mediada por células com uma resposta mista de citocinas Th1 e Th2 desenvolve-se uma infecção clínica (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bordeau & Ferrer, 2008; Maia & Campino, 2012).

O tipo de resposta imune (Th1 ou Th2) é determinado sobretudo pelas citocinas que contactam primariamente com o antígeno. Deste modo, o elemento decisivo no desenvolvimento da susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* spp. parece ser a capacidade das células T CD4+ manterem o receptor para IL-12 mais do que as 48 horas que se seguem à infecção. A IL-12 é crucial para o controlo efectivo da mesma, através da indução da actividade das NK e produção de IFN- γ (Ferrer, 2002b citado por Faria, 2008).

No único estudo onde se caracterizou a resposta imunitária local desenvolvida por um felino co-infectado por *Leishmania* spp. e pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), verificou-se, nas lesões cutâneas, oculares e orais, a existência de numerosos linfócitos CD4+, células plasmáticas IgG+, macrófagos e células gigantes multinucleadas, com formas amastigotas

de *Leishmania* spp. no seu interior. Alguns linfócitos e a maioria dos macrófagos e das células gigantes multinucleadas estavam associados à expressão de antígenos-MHC classe II. Apesar da co-infecção com FIV a resposta imunitária local (Tipo IV) parece ter sido responsável pela não disseminação sistêmica da infecção (Rodriguez *et al.*, 2002, citado por Martins, 2011). Pensa-se então que nos felinos a resposta imune mediada por células, na ausência de agentes imunossupressores, é suficiente para controlar a infecção, conferindo um certo grau de resistência natural (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010). Existem ainda autores que referem que a resistência natural aparentemente demonstrada pelos felinos pode ainda estar relacionada com factores genéticos (Pennisi, 2002; Mancianti, 2004; Vita, Santori, Aguzzi, Petrotta & Luciani, 2005).

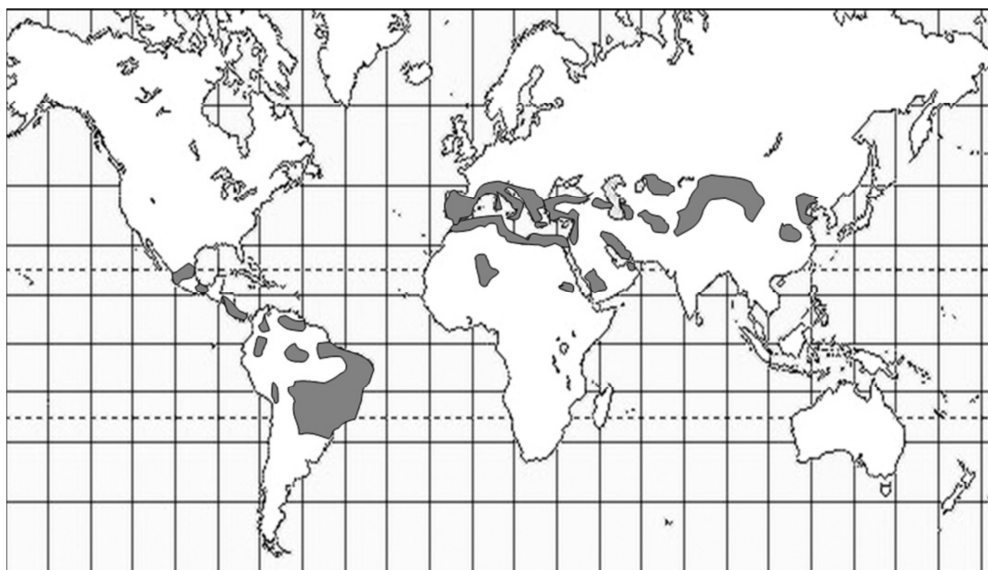
4. Epidemiologia

A leishmaniose humana apresenta diferentes manifestações clínicas, entre elas a LV considerada a forma mais grave e que quando não tratada leva à morte, e a leishmaniose cutânea (LC) que embora não seja fatal, é responsável por um grau de morbidade considerável, num grande número de pessoas que habitam em focos endêmicos (OMS, 2010; Gramiccia, 2011).

Dado o impacto da leishmaniose na saúde humana a Organização Mundial de Saúde (OMS) já classificou esta doença como uma das doenças tropicais mais negligenciadas, estimando-se que 350 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença, ocorrendo anualmente cerca de 2 milhões de novos casos (OMS, 2010). As maiores prevalências surgem nas zonas intertropicais da América e África, estendendo-se pelas regiões temperadas da América Latina, Europa e Ásia (Fig. 4) (Gramiccia, 2011).

Figura 4 – Distribuição geográfica da LV zoonótica causada por *L. infantum*.

(fonte: Gramiccia, 2011).



A espécie *L. infantum* MON-1 é o principal agente etiológico da leishmaniose nos países da bacia Mediterrânica, (Campino *et al.*, 2005), sendo considerado o principal agente etiológico da LV e um dos agentes responsáveis pela LC (Dedet *et al.*, 2003 citados por Cortes *et al.*, 2006).

As leishmanioses são doenças dinâmicas, e a emergência e/ou reemergência destas parasitoses devem-se a uma multiplicidade de factores, de entre os quais se destacam as modificações ambientais; as condições socio-económicas que levam à migração da população das zonas rurais para zonas urbanas e peri-urbanas; as mudanças no habitat dos hospedeiros naturais e vectores; as condições imunossupressoras; e a resistência dos parasitas e dos vectores aos fármacos e insecticidas em uso (Campino *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Reithinger & Davies citados por Campino & Maia 2010).

5. Importância da leishmaniose na Saúde Pública e Veterinária

A leishmaniose zoonótica causada por *L. infantum* constitui um grave problema veterinário e de saúde pública, atendendo à morbilidade e mortalidade que causam, em particular nos países da bacia Mediterrânica (Campino & Abranches, 2002; Campino & Maia, 2010).

O controlo da leishmaniose representa um dos maiores desafios para o conceito de “One Health” e, trata-se de um exemplo claro da necessidade da união e do trabalho conjunto da medicina humana e veterinária, no sentido do desenvolvimento de estratégias de manejo e eliminação desta doença (Day, 2011).

6. Leishmaniose em Portugal

Portugal é uma região endémica de leishmaniose humana e canina (Afonso, 2011). A LV é a forma clínica mais frequente, mas vários casos de LC têm sido diagnosticados. O primeiro caso de LV infantil foi descrito em 1910, em Lisboa (Álvares, 1910, citado por Maia, Nunes & Campino, 2008), e o primeiro caso de LC foi descrito em 1943, na região do Alto Douro (Tavares, 1943 citado por Campino *et al.*, 2006).

No nosso país, tal como em outros países do Sul da Europa, a doença foi considerada predominantemente infantil, contudo, tem-se verificado uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infecção em adultos, principalmente associado a casos de VIH/SIDA (vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida). A LV é uma doença de notificação obrigatória, desde 1950, mas os números oficiais são frequentemente subestimados (Campino *et al.*, 2006; Campino & Maia, 2010).

Ainda que existam três focos endémicos mais relevantes: a Região do Alto Douro (RAD), a Região Metropolitana de Lisboa (RML), e a Região do Algarve (RA), observam-se casos esporádicos de leishmaniose em todo o país (Campino *et al.*, 2006).

A LCan tem sido alvo de várias pesquisas. Estudos epidemiológicos realizados na RML indicaram uma maior prevalência da infecção canina na área rural (8,8%) do que na área urbana/sub-urbana (3,8%) (Abranches *et al.*, 1983, citados por Campino & Maia, 2010).

A infecção canina na RAD, em 1989, foi determinada em 10,4%, em Peso da Régua, (Sampaio-Silva *et al.*, 1993 citado por Cardoso *et al.*, 2004b) e 20,4% para a mesma localidade dez anos depois (Cardoso *et al.*, 2004b).

Em 1989, a região de Alijó apresentou uma prevalência de 37,8% de cães infectados mas no ano de 2000 a prevalência estimada foi menor, 18,7% (Cardoso *et al.*, 2004a).

Na década de noventa, um estudo serológico efectuado na população canina em 14 aldeias do distrito de Évora (Alentejo) revelou 3,9% de animais infectados (Semião-Santos *et al.*, 1995).

Na RA, a prevalência da infecção canina encontrada em Faro, em 1994, foi de 7% (Campino *et al.*, 1995 citados por Campino & Maia, 2010).

Em 2006, foi realizado um novo estudo para determinar a seroprevalência da leishmaniose canina na RA, tendo-se detectado valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* em 28,8% dos animais estudados (Maia *et al.*, 2007 citados por Campino & Maia, 2010).

No período de 2005-2006, Faria (2008) realizou um rastreio serológico em 128 cães provenientes de freguesias do concelho de Vila Franca de Xira, e obteve uma prevalência de 47,44% para os 78 cães domésticos testados, e 46% para os 50 cães provenientes de um canil da região.

O inquérito realizado por Sousa *et al.* (2008) abrangendo os 12 concelhos do distrito de Coimbra revelou que, em 2006, 843 casos de LCan tinham sido diagnosticados; e das 100 amostras de sangue recolhidas a cães da mesma região em 2007, 10,1% apresentaram anticorpos com títulos superiores a 80, e em 12,5% das 72 amostras de medula óssea foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* spp..

Cortes *et al.* (2007) realizaram um inquérito epidemiológico canino na área urbana/sub-urbana da Grande Lisboa obtendo uma prevalência de infecção de 19,2%; e em 2007-2008 a prevalência observada por Maia *et al.* (2010) foi de 20,4%.

Em 2011, Sousa *et al.* (2011) chegaram a uma seroprevalência de 21,3% em cães do Nordeste de Portugal.

Recentemente foi publicado um rastreio serológico realizado no ano 2009, envolvendo 3974 cães provenientes dos 18 distritos de Portugal Continental: Norte, Centro, Alentejo, Lisboa e Algarve, e a prevalência global encontrada foi de 6,31% (Cortes *et al.*, 2012). No rastreio epidemiológico de doenças transmitidas por vectores realizado por Cardoso *et al.* (2012), realizado entre 2010-2011, as prevalências de infecção por *L. infantum*, variaram entre 3,6% e 18,6% para a região Norte, 0,9% e 25,4% para a região Centro, 5,9% e 27,2% para o Alentejo, 7,9% e 30,2% para Lisboa, 3,8% e 25,7% para o Algarve, respectivamente para os 557 animais sem sinais de doença rastreados e para os 628 cães clinicamente suspeitos,

0% foi a prevalência encontrada para ambos os grupos de cães provenientes dos Açores e 0% para os cães sem sinais de doença da Madeira.

A leishmaniose felina também tem sido descrita em Portugal. O primeiro caso clínico ocorreu em 1994, em Sesimbra (Costa Durão *et al.*, 1994, citados por Maia *et al.*, 2008), tendo sido recentemente descritos mais 2 casos, um no Porto (Marcos *et al.*, 2009) e outro em Portimão (Sanches, Cardoso, Pereira & Carvalho, 2009), ambos no ano de 2009. Para além dos casos clínicos também têm sido efectuados, sobretudo, na RML, rastreios epidemiológicos para detectar a infecção nesta espécie. Entre 2003-2005, uma amostra de 180 gatos foi testada por IFI para a infecção por *Leishmania* spp., tendo sido encontrada uma prevalência de 0,6% (Duarte *et al.*, 2010). Maia *et al.* (2008) realizaram um estudo no ano de 2004, testando 23 gatos errantes e encontraram ADN de *L. infantum* no sangue de 30,4% dos animais. Também na RML, no período de 2007-2008, Maia *et al.* (2010), detectaram ADN de *Leishmania* spp. em 20,3% dos 142 gatos testados, enquanto 1,3% dos animais eram seropositivos por IFI. Utilizando a mesma técnica serológica na zona de Vila Franca de Xira, em 2005-2006, e na área Metropolitana de Lisboa, em 2008-2009, não foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* em nenhum dos animais testados (Faria, 2008 e Rosa, 2009). No trabalho realizado no Norte de Portugal entre 2004-2008, a seroprevalência encontrada foi de 2,8% (Cardoso, Lopes, Sherry, Schallig & Solano-Gallego, 2010). Recentemente, em Setúbal, foi determinada uma prevalência de 2% de gatos infectados por PCR em tempo real (qPCR) (Martins, 2011). Em 2012, Carreira (2012) detectou ADN de *L. infantum* em 2,1% dos 95 gatos rastreados da RML e a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em 6,3% dos animais.

A infecção por *Leishmania* spp. em outras espécies animais tem também sido investigada, tendo Abranches *et al.* (1984) encontrado uma seroprevalência de 23% em raposas no parque natural da Arrábida (Mancianti *et al.*, 1994).

No presente ano (2012) 33,3% (9/27) dos *Mus musculus* capturados em dois canis dos concelhos de Sintra e de Sesimbra revelaram a presença de ADN de *Leishmania* spp., através da técnica de qPCR, enquanto no exame parasitológico e histopatológico, a taxa de infecção foi de 18,5% (5/27), para a espécie *Rattus norvegicus* a taxa de infecção foi de 33,3% (1/3), apurada através de exame parasitológico (Helhazar, 2012).

Com outros objectivos, nomeadamente, a identificação da existência de polimorfismo isoenzimático, entre 1982 e 2005, Campino *et al.* (2006) estudaram 213 estirpes de *Leishmania* spp. isoladas em diferentes regiões de Portugal. Estas amostras foram obtidas a partir de casos de LV e LC diagnosticados em indivíduos imunocompetentes (adultos e crianças) e adultos imunocomprometidos, bem como a partir de cães e flebotomíneos. Todas as estirpes foram identificadas como *L. infantum* tendo sido identificado em 96,7% das estirpes o zimodeme MON-1.

Posteriormente, e com o objectivo de avaliar a diversidade genética de isolados portugueses Cortes *et al.* (2006) analisaram, através da técnica de PCR-RFLP 120 dos isolados obtidos por Campino *et al.* (2006) tendo sido observados 13 perfis de restrição (de A para M), com predominância do perfil A. Estes resultados sugerem que Portugal, apesar de apresentar homogeneidade quanto à espécie de *Leishmania* e zimodemes, apresenta uma grande heterogeneidade genética.

7. Leishmaniose felina (LFel)

A leishmaniose em gatos causada por *L. infantum* foi descrita pela primeira vez em 1912 na Argélia, a partir de uma casa onde um cão e uma criança também se encontravam infectados (Sergent *et al.*, 1912, citado por Solano-Gallego *et al.*, 2007). Posteriormente surgiram em vários países onde a leishmaniose zoonótica está presente, relatos sobre a infecção assintomática ou doença clínica em gatos (Tabela 9 do Anexo II).

A infecção por *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum* (*L. chagasi*), *L. major*, *L. tropica* e *L. mexicana* em gatos tem sido relatada em muitos países, incluindo Arábia Saudita, Argélia, Argentina, Brasil, Egipto, Espanha, Estados Unidos da América, França, Grécia, Guiana Francesa, Honduras, Irão, Iraque, Israel, Itália, México, Portugal, Suíça, Venezuela e Vietname. Até ao momento foram registados um total de 64 casos clínicos, e quanto aos rastreios epidemiológicos realizados nos diversos países a prevalência oscilou entre 0 e 68% (com base nos dados apresentados na Tabela 9 do Anexo II).

Os casos clínicos de LFel têm sido relatados, principalmente, em áreas onde a leishmaniose é endémica. A comparação entre os vários estudos epidemiológicos realizados é por vezes difícil devido à variabilidade das populações em estudo, e à aplicação de técnicas de diagnóstico com diferentes metodologias. Contudo, a prevalência de LFel por *L. infantum* é regra geral baixa, o que tem sido explicado por uma possível resistência natural do gato para esta infecção; por outro lado, o número de casos pode estar subestimado pela subnotificação da doença, e pelo desconhecimento da mesma por parte dos clínicos (Ayllón *et al.*, 2008).

Embora a leishmaniose seja considerada uma doença rara em gatos, os avanços nas técnicas de diagnóstico associados ao interesse científico e aos maiores cuidados de saúde dedicados à espécie felina, evidenciam um aumento na incidência da infecção por *Leishmania* spp. nesta população.

7.1 Sinais clínicos

Os casos clínicos de LFel são caracterizados principalmente por lesões cutâneas, embora o envolvimento visceral também já tenha sido descrito, em associação, ou como manifestação individual (Pennisi, 2002; Simões-Mattos *et al.*, 2004, citados por Cardoso *et al.*, 2010).

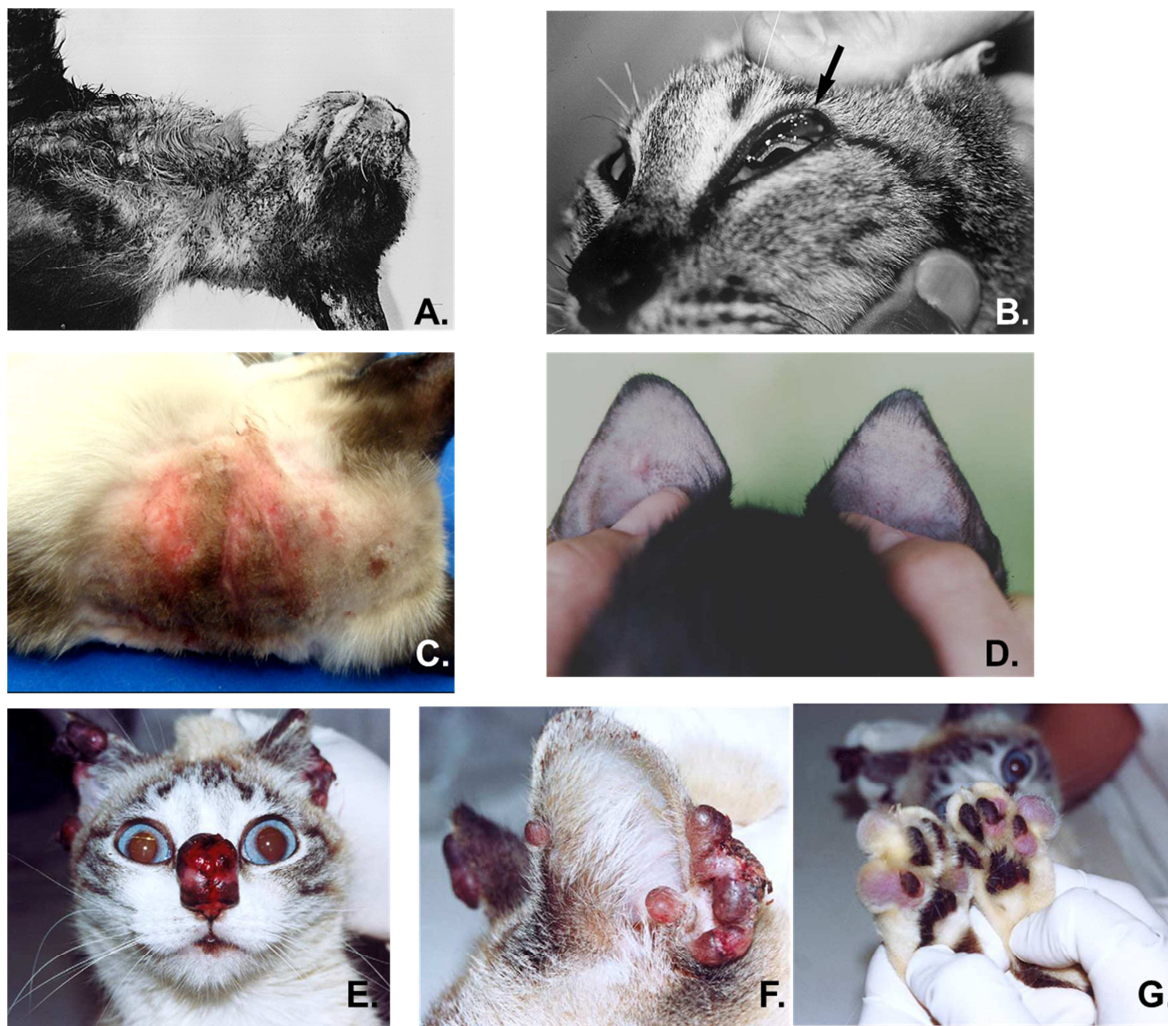
A sintomatologia apontada para a LFel têm-se baseado nos dados publicados por alguns autores, e os sinais clínicos causados por esta infecção, em gatos, não estão ainda bem definidos (Ayllón *et al.*, 2008). No entanto, na LFel causada por *L. infantum* as lesões mais frequentes são a dermatite nodular e ulcerocrostosa, alopecia e descamação (Ozon *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Poli *et al.*, 2002, Pennisi *et al.*, 2004; Rufenacht *et al.*, 2005), sendo a forma visceral da doença menos comumente descrita, envolvendo o baço, fígado, linfonodos, medula óssea, olhos e rins (Ozon *et al.*, 1998; Leiva *et al.*, 2005; Hervás *et al.*, 1999, 2001, citados por Sherry, 2010).

Os sinais clínicos cutâneos compatíveis com esta infecção incluem nódulos cutâneos, pápulas, pústulas, erosões, úlceras, crostas, eritema, alopecia localizada ou difusa e seborreia (Fig.5) (Schawwalder, 1977, Craig *et al.*, 1986, Barnes *et al.*, 1993, Passos *et al.*, 1996, Ozon *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Pennisi, 2002, Poli *et al.*, 2002, Pennisi *et al.*, 2004, citados por Rufenacht *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2005; Grevot *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010; Rougeron *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012) enquanto a anorexia, a disorexia, a perda de peso, a atrofia muscular, a depressão, a desidratação, a linfadenomegália generalizada, a esplenomegália, a anemia, a febre, o vômito, a diarreia, e a icterícia são os sinais associados à doença sistêmica (Ozon *et al.*, 1998; Schubach *et al.*, 2004; Vita *et al.*, 2005; Grevot *et al.*, 2005; Hervás *et al.*, 1999, Pennisi, 2002, citados por Rufenacht, *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2008; Nasereddin *et al.*, 2008; Marcos, *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012). Erosões ou úlceras nas mucosas ou junções mucocutâneas e mucosas congestionadas também já foram descritas, assim como lesões oculares, tais como uveíte, panuveíte, glaucoma; corrimento ocular e nasal; e ainda otites (Vita *et al.*, 2005; Leiva *et al.*, 2005). Não obstante, o número de casos assintomáticos é elevado, sendo frequente detectar em estudos epidemiológicos animais infectados com parasitas presentes na circulação sanguínea sem qualquer sinal de doença e até com bom estado corporal (Maia & Campino, 2008; Diakou *et al.*, 2009).

Um dado importante a realçar é que tal como ocorre na LCan, os sinais clínicos associados à LFel não são patognomónicos, sendo semelhantes a muitas outras doenças comumente encontrados em gatos. Sendo assim, a LFel deveria passar a ser incluída sistematicamente, na prática clínica, como um diagnóstico diferencial, especialmente, em áreas endémicas de *Leishmania* spp. (Grevot *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005).

Figura 5 – Algumas lesões causadas por *Leishmania* spp. em gatos.

(fontes: Ozon *et al.*, 1998; Poli *et al.*, 2002; Simões-Matos *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2005; Vides *et al.*, 2011).



Legenda: **A** - Felino com lesões cutâneas generalizadas causadas por *L. infantum*, alopecia, dermatite ulcerocrostosa, seborreia húmida, caquexia e mau estado geral. **B** - nódulo ulcerado na pálpebra esquerda; *L. infantum*. **C** – Zona cervical com alopecia, eritema e exsudação causadas por *L. chagasi*. **D** – Pápula na orelha de um gato infectado experimentalmente com *L. braziliensis*. **E** – Lesão nodular sobre o plano nasal, **F** - Nódulos de diferentes tamanhos nos pavilhões auriculares, **G** - Nódulos de diferentes tamanhos sobre as regiões digitais das patas causadas por *L. amazonensis*.

7.2 Factores de Risco

A identificação de factores de risco associados à infecção por *Leishmania* spp. pode ser útil para o estabelecimento de medidas preventivas, mas as informações para esta infecção em gatos são ainda escassas.

No que diz respeito a factores intrínsecos ao hospedeiro, a maioria dos estudos indica que não existe predisposição de sexo, idade e/ou raça (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Tabar *et al.*, 2008; Ayllón *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011). Contudo, Pennisi (2002) verificou existir uma predisposição do sexo

feminino e de animais de raça Europeu Comum, enquanto Cardoso *et al.* (2010) observaram uma seroprevalência mais elevada em gatos com mais de 24 meses.

Quanto aos factores extrínsecos, a permanência dos gatos dentro ou fora de casa também tem sido investigada. Tem sido sugerido que animais que habitam no exterior são mais afectados (Vita *et al.*, 2005). Cardoso *et al.* (2010) detectaram uma diferença significativa entre os gatos provenientes de um ambiente rural, que apresentaram maior seroprevalência de infecção, em comparação com os animais provenientes de áreas urbanas. Nasereddin *et al.* (2008) encontraram também uma correlação significativa entre a altitude (> 762 m acima do nível do mar) e a seropositividade para *Leishmania* spp.. Por outro lado, alguns autores sugerem a possibilidade da infecção por vírus imunossupressores (FIV, FeLV – vírus da leucose felina e PIF – vírus da peritonite infecciosa felina), ou que a ocorrência simultânea de doenças auto-imunes ou tumores, pudessem favorecer a multiplicação do parasita e a apresentação de manifestações clínicas da doença, como também ocorre no homem com o VIH (Grevot *et al.*, 2005; Sherry *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011). No entanto, a maioria dos estudos serológicos e moleculares não encontram relação entre a infecção por *Leishmania* spp. e a presença concomitante destes vírus (Poli *et al.*, 2002; Schubach *et al.*, 2004; Vita *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Rufenacht, 2007; Tabar *et al.*, 2008; Marcos, 2009; Maia *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011).

8. Diagnóstico

O diagnóstico precoce da leishmaniose é de elevada importância, de forma a evitar o desenvolvimento de lesões graves ou mesmo a morte do paciente e como medida de controlo. Um método de diagnóstico eficaz, para além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica, deve detectar a infecção em portadores assintomáticos, ter uma alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, ser simples, de fácil execução, barato e viável em laboratórios regionais ou adaptável para condições de campo (Maia *et al.*, 2007).

No entanto, o diagnóstico laboratorial da LFel ainda representa um desafio, apesar dos progressos alcançados no desenvolvimento de vários métodos, não é possível indicar um teste de diagnóstico de referência ou “gold standard”.

Por outro lado, os clínicos que ainda não estão familiarizados com a ocorrência desta doença em gatos, podem nunca vir a diagnosticá-la por ausência de uma suspeita clínica (Gramiccia, 2011).

8.1. Diagnóstico parasitológico

Os métodos clássicos de diagnóstico parasitológico da leishmaniose consistem na pesquisa dos parasitas por exame directo ou por exame cultural, efectuados a partir do material

biológico infectado. Um diagnóstico conclusivo pode ser obtido por meio da observação microscópica das leishmanias em esfregaços de órgãos e tecidos infectados, nomeadamente, da medula óssea, linfonodos ou pele. Na maioria deste tipo de análise as amostras são obtidas utilizando procedimentos invasivos, o que geralmente não é praticável para a detecção do parasita em animais assintomáticos (Alvar *et al.*, 2004, citado por Maia & Campino, 2008). Nos esfregaços corados com Giemsa observam-se formas amastigotas livres ou intracelularmente em monócitos, macrófagos e neutrófilos. O citoplasma apresenta-se azul pálido, com um núcleo relativamente grande basofílico e o cinetoplasto vermelho escuro ou violeta (Poli *et al.*, 2002; Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011). A visualização de uma só célula parasitada é patognomónica da infecção por *Leishmania* spp..

De acordo com Ferrer (1999) e Alvar *et al.* (2004, citados por Maia & Campino 2008), a microscopia de esfregaços de medula óssea e de linfonodos de cães infectados apresenta uma sensibilidade de 60-75% e 30-50%, respectivamente.

A análise histológica de órgãos infectados coradas com hematoxilina e eosina também tem sido utilizada para detectar a presença de parasitas, porém é uma técnica mais morosa pois a detecção destes pequenos parasitas em cortes histológicos é mais difícil. Ao exame histopatológico, a característica mais comum em lesões oculares, cutâneas e lesões nas junções mucocutâneas de gatos, foi a inflamação granulomatosa difusa com numerosos macrófagos apresentando amastigotas. Esta reacção é caracterizada por infiltração difusa de macrófagos, um número variável de linfócitos e células plasmáticas e, em menor extensão, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Ravel *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2010).

A imuno-histoquímica aplicada aos cortes histológicos pode ser utilizada como uma ferramenta complementar para confirmar o diagnóstico de leishmaniose particularmente, em órgãos que não têm uma carga parasitária elevada (Navarro *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011).

É importante ter em conta que todos estes métodos podem produzir resultados falsos negativos, pois a sua sensibilidade depende da carga parasitária, ou resultados falsos positivos, se artefactos forem erroneamente considerados como formas amastigotas (Alvar *et al.*, 2004, Baneth & Aroch, 2008, Gomes *et al.*, 2008, citados por Maia & Campino 2008).

A cultura *in vitro* a partir de tecidos pode melhorar a sensibilidade de detecção do parasita. As culturas são examinadas semanalmente para observar a presença de promastigotas. Apesar de apresentarem 100% de especificidade, as culturas são hoje em dia menos utilizadas para o diagnóstico, atendo às suas desvantagens: longo período de incubação, a dependência da carga parasitária e, por vezes, a dificuldade na sua realização pela inadaptação do isolado ao meio de cultura. Porém, é ainda necessária para obter um número suficiente de parasitas para a identificação isoenzimática, para usar como um antigénio para diagnósticos imunológicos, para modelos de infecção experimental, bem como para a avaliação *in vitro* de fármacos (Maia & Campino, 2008).

8.1.1. Diagnóstico molecular

Os métodos baseados na técnica de PCR são mais fiáveis para a determinação da presença e identificação do parasita, não só em casos de infecção activa, mas também para a detecção de animais assintomáticos ou para a monitorização do tratamento. Esta técnica permite a amplificação de sequências específicas do genoma de *Leishmania* spp. utilizando uma ampla gama de amostras biológicas tais como: sangue periférico, punções aspirativas da medula óssea ou linfonodos, biópsias de pele e células conjuntivais (Cortes *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2006). Portanto, em muitos casos permite realizar um diagnóstico sem provocar dor ou grande desconforto ao animal na obtenção de uma amostra.

Várias sequências iniciadoras ou “primers” foram desenhados para amplificar as sequências alvo, muitas tendo, tal como as utilizadas neste estudo, como base os minicírculos do cinetoplasto (kDNA) que proporcionaram um diagnóstico sensível e rápido. Porém a eficácia deste método está dependente de diversos factores como o tipo de “primers”, o número de cópias obtidas, o método de extracção de ADN, o material biológico e o próprio protocolo de PCR (Alvar *et al.*, 2004, Cortes *et al.*, 2004, Baneth e Aroch, 2008, citados por Maia & Campino 2008).

A variante quantitativa (qPCR) permite a monitorização contínua da amplificação de sequências de ADN específicas e a quantificação precisa do ADN do parasita presente em cada amostra. As vantagens da qPCR em comparação com técnicas convencionais de PCR são: a redução no tempo de execução e o facto de facilitar o controlo da carga parasitária durante, e após, a instituição de um tratamento (Mortarino *et al.*, 2004, Rolão *et al.*, 2004, Gomes *et al.*, 2008, citados por Maia & Campino 2008).

8.2. Diagnóstico serológico

Como acima referido, o diagnóstico definitivo da LV é geralmente baseado na detecção do parasita. No entanto, o processo de colheita é invasivo e as técnicas parasitológicas “convencionais” pouco sensíveis levaram ao desenvolvimento de métodos seroimunológicos para o diagnóstico da infecção, os quais tiram partido da elevada produção de anticorpos na LV (Sundar & Rai, 2002, citados por Maia & Campino, 2008), principalmente em indivíduos imunocompetentes e em cães. O diagnóstico serológico também tem sido usado para o diagnóstico da LFel.

A susceptibilidade dos gatos domésticos à leishmaniose tem sido investigada através de estudos experimentais como é o caso de Kirkpatrick *et al.* (1984) que inocularam gatos com *L. donovani* e *L. chagasi*; e de Simões-Mattos *et al.* (2005) que infectaram gatos com *L. braziliensis*. Em ambos os estudos todos os animais desenvolveram elevados títulos de anticorpos séricos anti-*Leishmania*. No estudo de Simões-Mattos *et al.*, o pico de títulos de anticorpos foi verificado às 20 semanas após infecção quando as lesões cutâneas estavam já em fase de resolução, verificando-se assim uma baixa relação entre o tamanho das

lesões e os títulos de anticorpos. Deste modo a serologia não parece ser um bom marcador do curso clínico da LFel causada por espécies dermatrópicas e, portanto, do ponto de vista epidemiológico, a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de gatos com lesões cutâneas pode levar a um diagnóstico clínico errado, uma vez que se pode tratar de uma fase inicial com baixa produção de anticorpos. Porém, outro dado importante deste estudo foi que 38% dos gatos continuaram a apresentar serologia positiva 72 semanas após infecção, evidenciando a importância do serodiagnóstico na identificação dos animais que mesmo sem infecção no momento, já tiveram contacto com o parasita.

Algumas das técnicas utilizadas no diagnóstico da leishmaniose são:

a) “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA) – as vantagens deste método prendem-se com a sua simplicidade e rapidez, para além de poder testar um número elevado de amostras simultaneamente, e poder utilizar uma diversa gama de antígenos (Maia & Campino, 2008).

Esta técnica tem vindo a ser modificada e um dos exemplos é a ELISA proteína A, em que em vez de se utilizar um segundo anticorpo, por exemplo anti-canino, é utilizada a proteína A marcada com peroxidase, que permite que o teste possa ser utilizado para analisar soros de outros hospedeiros vertebrados. Fisa *et al.* (1997, citados por Maia & Campino, 2008), usando a ELISA proteína A obtiveram uma sensibilidade e especificidade de 100% para o diagnóstico de LCan.

b) Teste de imunofluorescência indirecta (IFI) – este teste foi recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como método de referência para o diagnóstico serológico, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Gramiccia, 2011).

Esta metodologia permite a pesquisa de anticorpos presentes no soro a testar, e utiliza todo o corpo do parasita como antígeno, sendo útil em estudos epidemiológicos, na prática clínica e também no seguimento terapêutico (Gradoni, 2002, Mancianti *et al.*, 2002, Alvar *et al.*, 2004, citados por Maia & Campino, 2008).

No entanto, a sua aplicação apresenta algumas limitações, quer pelo facto de requerer um alto nível de habilidade e experiência e equipamentos de laboratório dispendiosos, quer pelas diluições em série do soro, o que faz com que este teste seja trabalhoso e pouco prático para o rastreio de um grande número de amostras (Maia & Campino, 2008).

Esta técnica apresentou em amostras portuguesas humanas e caninas uma sensibilidade de 83,3% (Campino, 1991) e 87,5% (Maia *et al.*, 2007), respectivamente (Maia & Campino, 2008). Mas a mesma técnica quando aplicada a soros de gatos apresentou títulos muito baixos não sendo suficientemente sensível para detectar a infecção (Maia *et al.*, 2008). De facto, vários autores têm referido que os títulos encontrados em gatos são muito mais baixos do que os detectados na LCan assintomática (Martín-Sánchez *et al.*, 2006, Poli *et al.*, 2002;

Solano-Gallego *et al.*, 2007, citados por Maia *et al.*, 2008). Desta forma, os limiares de positividade ou “cut-off” assumidos para soros felinos têm sido mais baixos (entre 1:40 e 1:100), mas sem uniformidade entre laboratórios (Ayllón *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2010a; Duarte *et al.*, 2010).

c) Teste de aglutinação directa (DAT) – o DAT desenvolvido por Harith *et al.* (1986) além de utilizar reagentes estáveis, é pouco dispendioso podendo ser utilizado em grande escala e apresenta resultados de fácil leitura e interpretação. Esta técnica faz uso de formas promastigotas integrais em suspensão ou numa forma liofilizada, como antigénios, e permite a pesquisa de anticorpos em plasma e/ou soro. Uma desvantagem da DAT é não permitir uma boa distinção entre indivíduos saudáveis e indivíduos em fase de remissão (Millesimo *et al.*, 1996, citados por Maia & Campino 2008). Apesar de no passado o antigénio utilizado ter de ser mantido a +4°C, a sua liofilização veio colmatar este problema, permitindo a sua manutenção a temperaturas elevadas e a sua utilização em estudos de campo (Harith *et al.*, 1989, citado por Maia & Campino, 2008). Uma variante deste teste é o teste de aglutinação rápida (FAST) que combina uma concentração mais elevada de parasitas com um menor volume de reagentes. Além disso, pode ser realizado com uma única diluição e os resultados são lidos após três horas. Apesar de os resultados se tratarem de resultados qualitativos este teste pode ser utilizado como um teste de triagem, especialmente em áreas endémicas (Cardoso *et al.*, 2004b).

d) Testes rápidos Imunocromatográficos – estes testes são muito úteis devido à facilidade de execução e pelo curto período de espera por um resultado, permitindo uma intervenção imediata por parte do veterinário. Contudo, a principal questão relativa ao seu uso, relaciona-se com a sua fiabilidade (Gradoni, 2002, citado por Maia & Campino 2008). Mancianti *et al.* (2002, citados por Maia & Campino 2008) avaliaram cinco kits comerciais imunocromatográficos comparando 50 soros de cães aparentemente saudáveis mas com diagnóstico parasitológico positivo. Atendendo aos resultados dos kits a sensibilidade e a especificidade variou de 34,9% a 76,2%, e de 61,1% a 100%, respectivamente.

Vários testes serológicos têm sido utilizados para o diagnóstico individual, bem como para estudos epidemiológicos, mas a utilização de diferentes antigénios, a variedade de procedimentos e as diferentes selecções para a diluição indicativa de positividade, evidenciam a necessidade de padronização. Mais ainda, os testes sorológicos apresentam vários problemas intrínsecos incluindo a persistência de anticorpos específicos após a resolução da infecção, ou a existência de reacções cruzadas com anticorpos contra outros patógenos, como *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (Coelho *et al.*, 2011). Assim é aconselhável que os resultados definitivos envolvam pelo menos duas técnicas, uma

sorológica e uma de diagnóstico directo, métodos parasitológicos ou moleculares (Gramiccia, 2011).

8.3. Resposta imune celular

A resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. é mediada por uma resposta imunitária celular. A maioria das ferramentas para a avaliação de respostas imunitárias celulares ainda não está disponível para a prática clínica. No entanto, um teste prático e padronizado para avaliar a resposta imune celular certamente seria aplicável clinicamente, tanto para acompanhar a evolução da leishmaniose e a resposta ao tratamento, como para ajudar a estabelecer um prognóstico (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

8.4. Outros testes

Importa referir que por vezes surgem alterações nos exames complementares de diagnóstico gerais em gatos com leishmaniose. As alterações hematológicas e bioquímicas detectadas incluem a diminuição do hematócrito, trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, leucopenia, linfopenia, eosinofilia, pancitopenia severa e auto-aglutinação de eritrócitos; sinais de comprometimento hepático: aumento dos níveis de fosfatase alcalina e de alanina transferase, hipercolesterolemia; sinais de insuficiência renal: azotemia e aumento da ureia e da creatinina séricas; hiperfosfatemia, hipermagnesiemia; hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, e proteinúria (Ozon *et al.*, 1998; Poli *et al.*, 2002; Schubach *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005; Rufebracht *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2008; Marcos, 2009; Silva *et al.*, 2010).

9. Diagnósticos diferenciais

Alguns dos diagnósticos diferenciais considerados, antes da leishmaniose ser tomada em conta são: a criptococose; a esporotricose; processos infecciosos crónicos (por autotraumatismo e infecção bacteriana subsequente); hipersensibilidade à picada de insectos; processos neoplásicos (carcinoma, linfoma, mastocitoma) e doenças auto-imunes (pênfigo foliáceo, pênfigo eritematoso) (Souza *et al.*, 2005; Grevot *et al.*, 2005; Rufenacht, *et al.*, 2007).

10. Tratamento

O tratamento dos cães com leishmaniose resulta numa melhoria clínica temporária, numa diminuição dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e na recuperação da capacidade de defesa através de uma resposta imune adequada. No entanto, o tratamento não previne

uma recorrência dos sinais clínicos e não impede que o animal se mantenha infectante para o vector (Baneth, 2002, citado por Faria, 2008).

Os principais compostos usados no tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), o alopurinol, a aminosidina, a miltefosina, a anfotericina B, a pentamidina, e mais raramente, os azóis (ketoconazol, miconazol, flucinazol e itraconazol), a espiamicina combinada com o metronidazol, a marbofloxacin, a enrofloxacin e a domperidona (Oliva *et al.*, 2010).

Poucos são os casos relatados da realização de terapêutica anti-*Leishmania* em gatos. Nos casos em que ocorrem lesões cutâneas nodulares, a excisão cirúrgica tem sido a opção escolhida (Craig *et al.*, 1986, citado por Rufenacht *et al.*, 2007). No entanto, casos cutâneos de apresentação mais difusa têm sido tratados com antifúngicos e antibióticos tópicos e por via parental, mas nenhum desses tratamentos resultou em melhoras significativas. A revisão de casos de LFel publicados por Pennisi (2002) enumera vários tratamentos, incluindo fármacos como o antimoniato de meglumina, uma combinação deste fármaco e cetozonazol, e o alopurinol, mas não existe um tratamento padronizado. A administração deste último tem levado à cura clínica em alguns animais (Savani *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010; Pocholle *et al.*, 2012).

No entanto, na maioria dos casos, o sucesso do tratamento foi avaliado apenas com base no desaparecimento dos sinais clínicos sem se ter analisado se o animal tinha atingido a cura parasitológica. Por outro lado, a eficácia da terapêutica foi também por vezes difícil de avaliar, atendendo à existência de co-infecções e doenças concomitantes (Rufenacht *et al.*, 2005).

10.1 Monitorização dos gatos infectados

Apesar da monitorização dos gatos infectados com ou sem tratamento ser difícil, é imprescindível para a compreensão da evolução clínica da LFel. Vita *et al.* (2005), conseguiram acompanhar 11 gatos domésticos que apresentaram serologia positiva para *Leishmania* spp., constatando que 2 deles mantiveram o mesmo título, 3 reduziram para títulos mais baixos e 6 deles tornaram-se seronegativos.

Num estudo semelhante, Martín-Sánchez *et al.*, (2007) verificaram que sete dos 27 gatos com leishmaniose continuaram a apresentar ADN do parasita no sangue periférico, três gatos inicialmente positivos por esta técnica, continuaram positivos, mas outros três gatos apresentaram PCR negativa do sangue periférico, mas aumentaram o nível de anticorpos. Em relação ao título de anticorpos determinado pela técnica de IFI, três dos 27 gatos aumentaram o título, dois mantiveram o mesmo título e os restantes positivos por esta técnica diminuíram.

10.2 Prognóstico

O prognóstico para esta doença é variável tendo em conta o tipo de lesões apresentadas e a cronicidade da infecção. Para um melhor prognóstico, o estabelecimento do diagnóstico correcto é fundamental a fim de evitar tratamentos sem sucesso direccionados para outras etiologias (Rufenacht *et al.*, 2005).

O proprietário deve ser informado de que o parasita mesmo com tratamento dificilmente será completamente eliminado, e que poderão ocorrer recidivas das lesões (Navarro *et al.*, 2010; Pocholle *et al.*; 2012).

11. Profilaxia

Até à data não estão descritos ectoparasiticidas com efeito repelente para flebotomíneos, que possam ser aplicados em gatos (as permetrinas, utilizadas como profilaxia da LCan, são tóxicas para os gatos), nem estudos de imunoprofilaxia, pelo que a protecção da população felina está muito dependente da implementação de medidas de controlo dos vectores, mas também da profilaxia aplicada aos cães.

11.1. Controlo dos vectores

O controlo dos vectores flebotomíneos é fundamental para o controlo da infecção por *Leishmania* spp..

Os flebótomos são sensíveis a diferentes tipos de insecticidas e são conhecidos poucos casos de resistência. No caso de espécies peridomésticas e endofílicas, podem ser usados insecticidas de acção residual, por exemplo redes mosquiteiras, impregnadas com piretróides (Urquhart *et al.*, 1996; Afonso e Alves-Pires, 2008).

No que diz respeito às espécies exofílicas o controlo vectorial passa pela higiene dos locais onde são mantidos os animais de produção, pelo cuidado de manter muros sem buracos e/ou pulverizados com soluções insecticidas reduzindo assim os microhabitats favoráveis aos flebotomíneos (Afonso, 2011).

11.2. Protecção dos Hospedeiros vertebrados

Sendo o cão considerado o principal reservatório da LV humana, as medidas de controlo destinadas à LCan visam também a redução da infecção nas pessoas (Gramiccia & Gradoni, 2007; Maroli *et al.*, 2010).

A prevenção das picadas dos flebótomos é uma ferramenta eficaz para proteger os cães da infecção por *Leishmania* spp. e assim reduzir o risco de infecções para os humanos. Neste domínio, vários estudos têm sido realizados e várias formulações têm sido apresentadas com indicações de eficácia contra a picada dos flebotomíneos, fazendo uso de piretróides sintéticos, deltametrina e permetrina, em várias apresentações tópicas: coleiras, “spot-on” e

em “spray”. Estes ectoparasiticidas são também amplamente recomendados para os cães em tratamento, uma vez que ainda não existe uma terapêutica 100% eficaz para eliminação do parasita, prevenindo-se assim transmissão de leishmanias para os vectores (Gramiccia & Gradoni, 2007; Maroli *et al.*, 2010).

O uso de repelentes na pele e na roupa pode ser eficaz para a protecção dos humanos, e a permanência dos animais dentro das habitações durante o período de maior actividade dos vectores (em especial, do anoitecer ao amanhecer), é também uma forma de prevenção da doença (Urquhart *et al.*, 1996; Afonso e Alves-Pires, 2008).

Outra medida recomendada pela Organização Mundial de Saúde é o abate de cães infectados (OMS, 2010). Com esta medida, verificou-se após o abate de animais seropositivos, uma diminuição na incidência de infecção em algumas áreas endémicas, tanto em cães como em seres humanos, mas a eficácia e aceitação desta estratégia de controlo é cada vez mais questionada (Quinnell & Courtenay, 2009). Além disso, a implementação dessa medida em países onde os cães são considerados membros da família não seria facilmente aceite ou praticável. Por outro lado, uma das razões pelas quais esta medida de controlo não previne ou diminui significativamente a transmissão da leishmaniose como esperado, deve-se à baixa cobertura do abate, e porque os cães abatidos são substituídos por novos cães susceptíveis à infecção (Silva *et al.*, 2010; Maia & Campino 2011). Mais ainda, deve ter-se presente que para além dos cães, outros hospedeiros intermediários tais como gatos, roedores e animais silváticos contribuem também para a manutenção da infecção *Leishmania* spp..

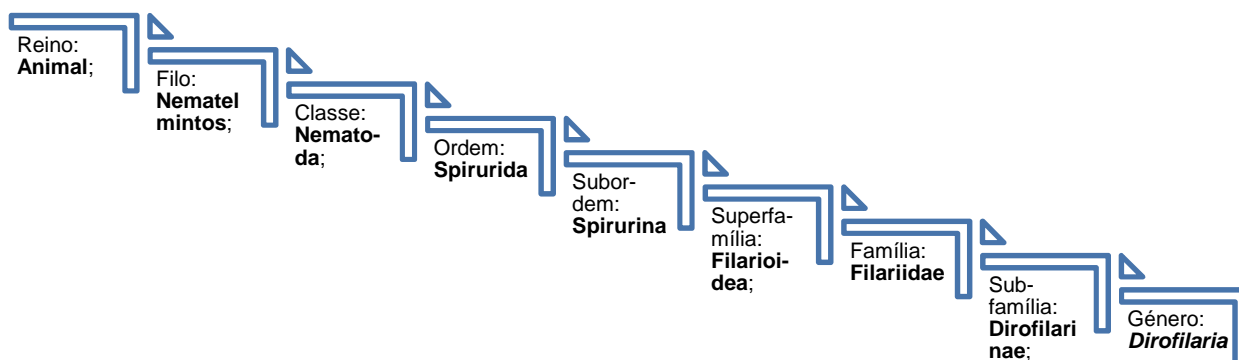
Das várias doenças parasitárias, a leishmaniose é teoricamente considerada como a mais provável a ser controlada por vacinação, uma vez que a resolução da leishmaniose em humanos resulta numa forte resistência à reinfeção. No entanto, o desenvolvimento de vacinas competentes tem sido difícil devido à complexidade e variabilidade antigénica dos parasitas. Todavia, existem actualmente três vacinas registadas para a prevenção da LCan duas no Brasil (Leishmune® e Leish-tec®) e a CaniLeish®, comercializada em todos os países europeus endémicos de leishmaniose (Maroli *et al.*, 2010). Os dados publicados relativos à aplicação da imunoprofilaxia no Brasil mostram que nas áreas em que a vacinação foi amplamente praticada, a prevalência da infecção canina e humana diminuiu (Day, 2011 citando Palatnik-de-Sousa).

II. B – Dirofilariose

1. Etiologia

A dirofilariose é uma doença parasitária cosmopolita, cujo agente etiológico é um nemátode do género *Dirofilaria*, transmitido pela picada de mosquitos culicídeos. Afecta principalmente cães, ocasionalmente gatos, e raramente os seres humanos (Urquhart *et al.*, 1996; American Heartworm Society [AHS], 2012).

Quanto à sua taxonomia, o género *Dirofilaria* pertence:



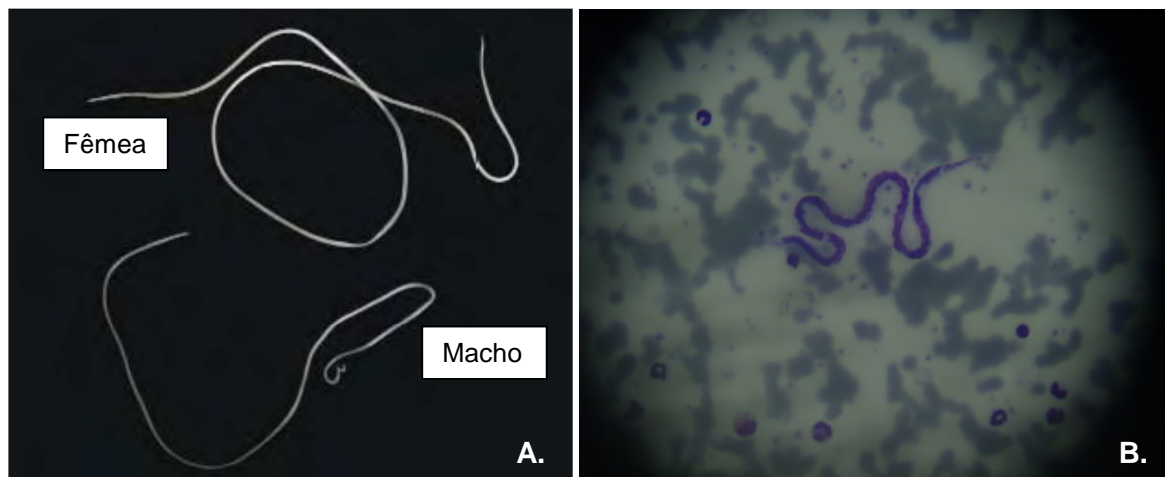
Do género *Dirofilaria* fazem parte duas espécies infectantes para os mamíferos, *D. immitis* (Leidy, 1856), parasita do sistema cardiovascular, e *D. (Nochtiella) repens*, que parasita o tecido subcutâneo. Das duas espécies, a primeira é sem dúvida a de maior interesse em medicina veterinária (Urquhart *et al.*, 1996; Monteiro, 2007; Tarello, 2011).

Morfologicamente, *D. immitis* apresenta um corpo cilíndrico longo, não segmentado, de extremidades afiladas, revestido por uma camada externa incolor, a cutícula, que lhe confere resistência. A sua locomoção deve-se à realização de movimentos ondulantes de contracção e relaxamento muscular que se alternam nas faces ventral e dorsal do parasita (Urquhart *et al.*, 1996).

Os machos são menores em relação às fêmeas (macho: 120 a 20 mm por 0,7 a 0,9 mm; fêmea: 250 a 310 mm por 1 a 1,3 mm), e enquanto as fêmeas apresentam uma extremidade posterior simples, os machos apresentam a extremidade posterior espiralada, com uma espícula grande e outra pequena e papilas pré e pós-cloacais (Fig.6). Quando ambos os sexos estão presentes, no hospedeiro vertebrado, pode dar-se a cópula, através da introdução das espículas presentes no macho no orifício genital da fêmea. As fêmeas são ovovivíparas e libertam as microfíliarias descapsuladas ou larvas L1 (primeira forma larvar de *D. immitis*), na corrente sanguínea, onde podem sobreviver entre dois a dezoito meses (Fig.6). Estas medem 315 µm de comprimento e 6 a 7 µm de largura. Os adultos alimentam-se do plasma do hospedeiro e podem viver vários meses, ou até mesmo anos (Manfredi, Cerbo & Genchi, 2007; Monteiro, 2007).

Nos gatos os parasitas adultos parecem ser menores do que em cães (Hayasaki, Okajima, Songa & Shiramizu, 2003; Carleton & Tolbert, 2004).

Figura 6 – Morfologia dos parasitas *D. immitis* na forma adulta (L5) e na primeira forma larvar (L1 ou microfilária).



A. Parasitas adultos, a olho nú (adaptado de Manfredi *et al.*, 2007); **B.** Microfilária, observação ao microscópio óptico 100x (fonte: Niatiegala, 2012).

2. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis*

Os parasitas do género *Dirofilaria* apresentam um ciclo biológico heteroxeno, com cinco fases larvares em desenvolvimento, três no hospedeiro invertebrado (vector), e duas no hospedeiro vertebrado.

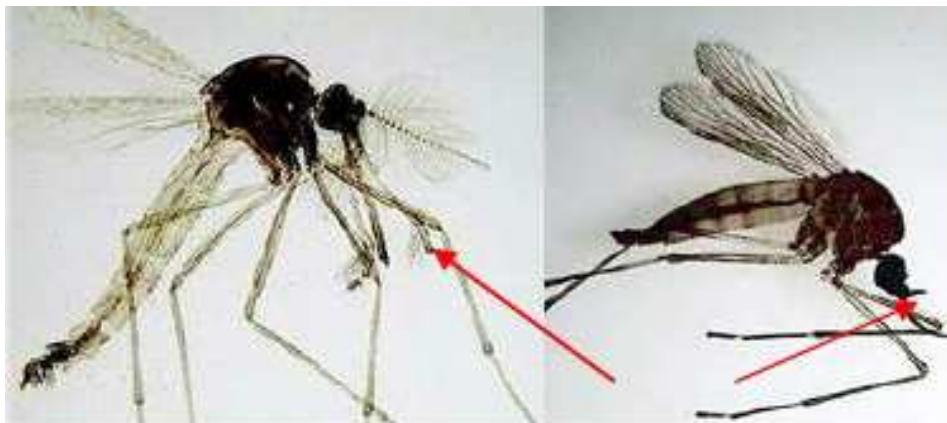
2.1. Hospedeiro Invertebrado

Os culicídeos são insectos pertencentes à Ordem Díptera, Subordem Nematocera e à Família Culicidae. Esta família contém mais de 3500 espécies pertencentes a 37 ou 95 géneros após elevação de vários subgéneros, dos quais os mais importantes para a saúde pública e medicina veterinária são os géneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* (Urquhart *et al.*, 1996; Cancrini & Gabrielli, 2007; Simón, Morchón, González-Miguel, Marcos-Atxutegi, & Siles-Lucas, 2009; Tarello, 2011; Almeida, 2011).

Morfologicamente, os adultos são dípteros de pequenas dimensões (2 a 10 mm de comprimento), delgados e com longas patas. Ambos os sexos possuem longas antenas segmentadas e filamentosas, pilosas nas fêmeas e plumosas nos machos. As peças bucais são constituídas por um probóscide saliente e alongado, projectado para a frente, adaptado para a perfuração e sucção (Fig.7). As asas são longas e estreitas, e apresentam escamas que se projectam como uma franja na borda posterior; em repouso, mantem-se cruzadas e sobrepostas sobre o abdómen (Urquhart *et al.*, 1996, Monteiro, 2007).

Estes insectos distribuem-se um pouco por todo o mundo (excepto Antártida) desde 1250 m abaixo do nível do mar (em minas) até 5500 m de altitude. Apresentam um raio de dispersão de sensivelmente 100 metros do local de alimentação (variável consoante a espécie), podendo contudo dispersar-se por longas distâncias através do vento (Urquhart *et al.*, 1996, Almeida, 2011).

Figura 7 – Morfologia dos insectos da Subfamília Culicinae.



Legenda: o macho encontra-se representado à esquerda e a fêmea à direita; as setas indicam os palpos maxilares do probóscide (fonte: Monteiro, 2007).

Quanto ao seu ciclo de vida, os adultos apresentam uma vida aérea e as fases imaturas uma vida aquática. Somente as fêmeas são hematófagas, enquanto os machos se alimentam de sucos vegetais. O seu pico de actividade varia com a espécie; há espécies nocturnas, outras activas ao amanhecer, e outras que se alimentam durante o dia podendo ainda apresentar mais do que um pico de actividade por dia (Cancrini & Gabrielli, 2007). Depois de se alimentarem de sangue, as fêmeas põem até 300 ovos na superfície da água. A eclosão e a maturação larvar dependem da temperatura. As larvas alimentam-se de matéria orgânica. A fase seguinte é a fase de pupa, que também são aquáticas, móveis e em forma de vírgula, e não se alimentam. Os adultos emergem através de uma fenda no tegumento pupal. Nas regiões temperadas, os ovos, as larvas e até os adultos de algumas espécies de culicídeos podem sobreviver ao Inverno (Urquhart *et al.*, 1996).

O papel destes vectores competentes na epidemiologia da dirofilariose pode ser influenciado por vários factores, tais como: a sua abundância; a existência de hospedeiros susceptíveis; a periodicidade da circulação de microfilárias nos hospedeiros reservatórios; os ciclos circadianos e sazonais da actividade do insecto que condicionam a frequência das refeições, e a sazonalidade do desenvolvimento das larvas de dirofilariose no próprio vector. Outros factores que podem modular a expressão da actividade dos vectores, são a idade do mosquito (os mais velhos são epidemiologicamente mais importantes em virtude da sua maior oportunidade de adquirir e transmitir agentes patogénicos), e o seu estado nutricional

(um período de privação de sangue torna mais intenso o padrão de actividade do mosquito) (Nayar & Sauerman, 1973, Klowden, 1996, citados por Cancrini & Gabrielli, 2007).

A transmissão da dirofilariose depende também do habitat dos vectores. Assim, em áreas suburbanas ou urbanas, os vectores endófilos terão um papel mais importante na transmissão aos animais domésticos, enquanto em zonas rurais, os vectores exófilos serão os responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre da dirofilariose (Labarthe & Guerrero, 2005; Ledesma & Harrington, 2011).

Cerca de 70 espécies de mosquitos têm a capacidade de permitir o desenvolvimento das microfilárias em formas infectantes L3, contudo menos de uma dúzia são considerados como vectores importantes (Genchi *et al.*, 1992, Cancrini *et al.*, 2007, citados por Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi & Cringoli, 2008a).

Na Europa, a actividade dos vectores está limitada a um período de tempo entre a Primavera e o Verão (Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012).

Em Portugal Continental estão assinaladas 41 espécies de mosquitos culicídeos, sendo as mais abundantes *Anopheles atroparvus*, *Culex pipiens*, *C. theileri* e *Aedes caspius*, e na ilha da Madeira foram relatadas seis espécies, *Aedes aegypti*, *C. hortensis maderensis*, *C. pipiens* L., *C. theileri*, *Culiseta longiareolata* e *Ochelerotatus eatoni* (Almeida, *et al.*, 2007, citado por Almeida, 2010; Almeida, 2011).

2.2. Hospedeiros vertebrados

Os cães são considerados os principais hospedeiros de *D. immitis*, no entanto, este parasita já foi relatado em lobos, coiotes, raposas, felinos (gato doméstico e felinos silvestres), pinípedes, mustelídeos (por exemplo, furões), ursos, pandas, castores, coelhos, veados, cavalos, primatas não humanos e humanos (Liu *et al.*, 2005; Manfredi *et al.*, 2007).

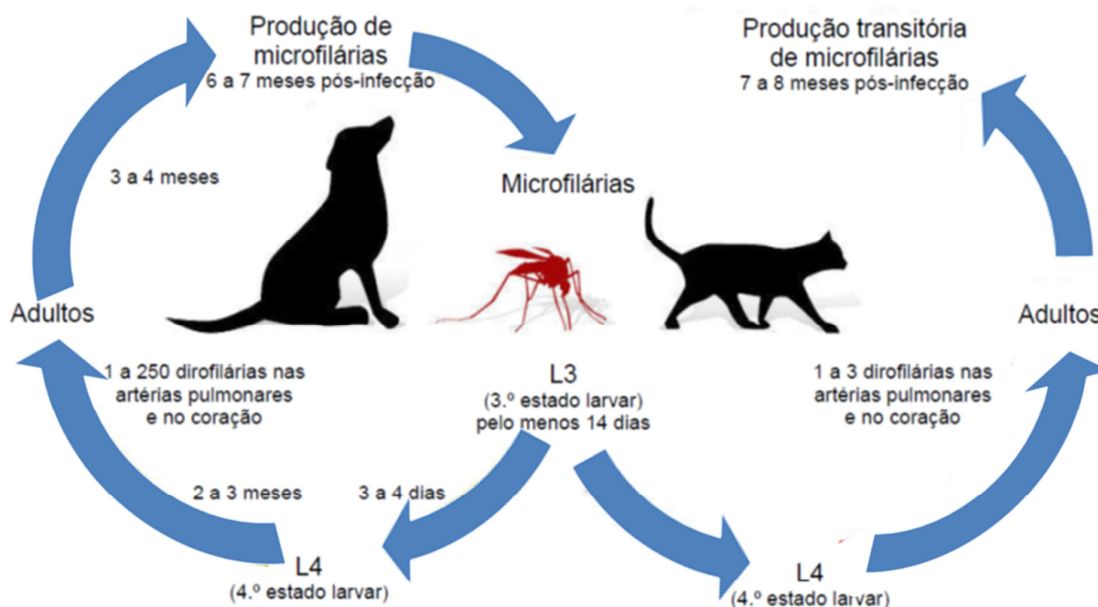
Os gatos para além de serem considerados menos atraentes para os mosquitos, comparativamente com o cão, são também considerados mais resistentes à infecção ou “hospedeiros imperfeitos”; contudo, em alguns casos apresentam sinais graves de doença (Genchi, Rinaldi & Cringoli, 2007; AHS, 2012).

Os seres humanos são hospedeiros acidentais para a infecção por *D. immitis* já que as larvas normalmente não se desenvolvem em formas adultas e as microfilárias estão ausentes (Simón *et al.*, 2007).

2.3. Descrição do Ciclo biológico de *D. immitis*

Figura 8 – Ciclo biológico de *D. immitis*.

(adaptado de: AHS, 2012)



A infecção vectorial inicia-se quando um culicídeo fêmea se alimenta num hospedeiro infectado e ingere as microfilárias de *Dirofilaria* (Fig.8). Uma vez ingeridas, as microfilárias atravessam a faringe e alcançam o intestino médio do vector, 24 horas depois chegam aos túbulos de Malpighi, tornando-se intracelulares. As mudas para L2 e, posteriormente, para L3, ocorrem em média 10 a 14 dias após a ingestão das microfilárias. Estas larvas saem dos túbulos de Malpighi e migram através da cavidade do corpo do mosquito (hemocélio), desde o abdómen para a cabeça. Ao entrarem na cabeça, as larvas infectantes (L3) instalam-se no aparelho bucal do vector (Monteiro, 2007, Ledesma & Harrington, 2011).

O número de larvas que consegue completar com sucesso o seu desenvolvimento depende da eficiência individual do vector, mas a invasão inicial das células de Malpighi pelas microfilárias, e a saída das larvas L3 são os dois momentos críticos para a sobrevivência do insecto. Cargas parasitárias elevadas podem levar à morte do mosquito, pelo que alguns vectores desenvolveram mecanismos de defesa a fim de reduzir o número de L1. O número máximo de larvas compatível com a sobrevivência dos insectos depende da espécie de mosquito e das espécies de *Dirofilaria* (Cancrini & Gabrielli, 2007).

A duração do ciclo de vida do parasita no interior do vector é dependente da temperatura (8-10 dias a 28-30 °C, 11-12 dias a 24 °C, e 16-20 dias a 22 °C) e o desenvolvimento larvar cessa a temperaturas inferiores a 14 °C, sendo retomado, contudo, se a temperatura subir (Cancrini & Gabrielli, 2007; AHS, 2012).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre aquando da alimentação de uma fêmea culicídea infectada com as larvas L3 (Fig.8). Um único mosquito pode transmitir, no máximo, 10 a 12 larvas L3 (Dillon, 2007, citado por Rosa, 2009). Estas larvas penetram na pele do hospedeiro no local da picada, ficando submersas por uma camada de hemolinfa para evitar a desidratação e facilitar o movimento das larvas para o interior do hospedeiro (Cancrini & Gabrielli, 2007).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita migra pelos tecidos subcutâneo, muscular e adiposo, onde sofre duas mudas (L3 para L4, e de L4 para L5). A muda para L4 ocorre em média dentro de três dias, enquanto a posterior muda para L5, ocorre em cerca de dois meses após o início da migração pelos tecidos. Estas L5 imaturas penetram numa veia periférica e por meio da corrente sanguínea alcançam, 70 a 90 dias após a infecção, o coração e as artérias pulmonares, locais onde se alojam e onde se dá a maturação final. As migrações errantes ocorrem mais frequentemente em gatos que em cães, e nessas situações os parasitas são encontrados em nódulos subcutâneos, em cavidades corporais, em artérias sistémicas e no sistema nervoso central (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). Todavia, a maioria dos parasitas acabam por morrer sob o efeito do sistema imunitário, e ao contrário do que ocorre na infecção do cão, nos gatos desenvolvem-se comumente 1-3 parasitas adultos (num intervalo de 1-8 parasitas) que sobrevivem apenas 2-3 anos (no cão sobrevivem 5-7 anos) (Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012). McCall *et al.*, (1992) realizaram um estudo experimental infectando cães e gatos com 100 larvas L3 de *D. immitis*, tendo observado o desenvolvimento de dirofilárias adultas em quase 100% dos cães, com aproximadamente 75 dirofilárias por canídeo, enquanto nos gatos as formas adultas apenas foram detectadas em 75% dos felinos com um número médio de 3-10 dirofilárias por animal (Kramer & Genchi, 2002). Estudos subsequentes têm corroborado a baixa taxa de parasitas que chegam à fase adulta em gatos (0% a 25%) em comparação com os cães (40-90%) (AHS, 2012).

Dos adultos que se desenvolvem, e quando não estão presentes apenas parasitas de um único sexo (um terço das infecções), machos e fêmeas sexualmente maduros acasalam e produzem microfilárias que são lançadas na circulação sanguínea do animal parasitado. No entanto, é raro encontrar microfilárias circulantes em gatos (menos de 20% dos casos), mas quando ocorrem, sete a oito meses após a infecção (no mínimo) raramente persistem mais de um a dois meses (Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012).

A microfilarémia apresenta variações ao longo do dia, encontrando-se em maior densidade à noite. As alterações na densidade de microfilárias no sangue representam uma adaptação evolucionária por parte destes parasitas para maximizar a absorção de microfilárias nos períodos de maior actividade dos mosquitos vectores, e podem depender de factores endógenos das microfilárias ou até da fototaxia (Hayasaki *et al.*, 2003). Quando não estão em circulação, as microfilárias encontram-se sequestradas nos pequenos vasos dos

pulmões, um local fisiologicamente favorável para a sua sobrevivência (Nogami *et al.*, 2000). Estudos experimentais realizados em gatos revelaram que nesta espécie, as microfilárias ocorrem periodicamente (intercalando períodos de escassez e abundância) com predominância noturna, tendo-se observado o pico de maior densidade entre as 21 horas (Hayasaki *et al.*, 2003) e as 22 horas, (Nogami *et al.*, 2000).

O período pré-patente é compreendido entre o momento da transmissão das formas L3 que originam a infecção, até à produção de microfilárias pelas filárias adultas, fenómeno que, no gato, ocorre cerca de 8 meses após a infecção (AHS, 2012).

2.4. Formas de transmissão independentes do vector

Embora menos comum, estão descritas duas formas de transmissão para além dos vectores culicídeos: a transmissão vertical pela via transplacentária, e a transfusão sanguínea. As microfilárias transmitidas por estas formas não têm capacidade para atingir a maturação, porque só no vector se completa o ciclo de vida do parasita, contudo continuam a ser infectantes para os mosquitos, contribuindo para a continuidade do ciclo (Monteiro, 2007; Nelson *et al.*, 2010).

3. O endossimbionte *Wolbachia*

As bactérias gram-negativas, *Wolbachia pipientis*, colonizam uma grande variedade de helmintes e artrópodes sendo consideradas um endossimbionte intracelular (Bandi *et al.*, 1998, McCall *et al.*, 2005, citados por Dingman *et al.*, 2010).

D. immitis é um dos parasitas que alberga esta bactéria, em todas as fases do seu ciclo de vida. Estas bactérias encontram-se na hipoderme, nos órgãos reprodutores femininos e nos ovos contendo as larvas L1 (sendo transmitidas verticalmente pelas fêmeas), e são libertadas em grandes quantidades do corpo do parasita durante as mudas, na produção de microfilárias, e quando os parasitas morrem (Bandi *et al.*, 1999, Taylor, 2003, Kramer *et al.*, 2003, Taylor *et al.*, 2005, citados por Dingman *et al.*, 2010). Bazzocchi *et al.* (2000) examinaram mais de 50 amostras de *D. immitis* recolhidas em várias partes do mundo e em todas elas, os parasitas albergavam bactérias *Wolbachia* spp..

A importância destas bactérias na patogenia da dirofilariose está relacionada com os seus lipossacarídeos que podem também desencadear reacções inflamatórias, e a produção de anticorpos anti-*Wolbachia* em cães, gatos, e até humanos acometidos pela doença. Deste modo, estas bactérias tornaram-se um alvo de tratamento com antibióticos a fim de reduzir não só a patologia inflamatória, mas também como modo de diminuir a fecundidade e a sobrevivência dos parasitas (Bazzocchi *et al.* 2000; Simón *et al.*, 2007).

4. Epidemiologia

A dirofilariose apresenta-se distribuída por regiões temperadas, tropicais e subtropicais, da América do Norte, Central e do Sul, África, Europa, sul da Ásia e Austrália (Urquhart *et al.*, 1996; Prieto, Venco, Simon & Genchi, 1997, citados por Simón *et al.*, 2009; Tarello, 2011, Morchón, Carretón, González-Miguel, & Mellado-Hernández, 2012).

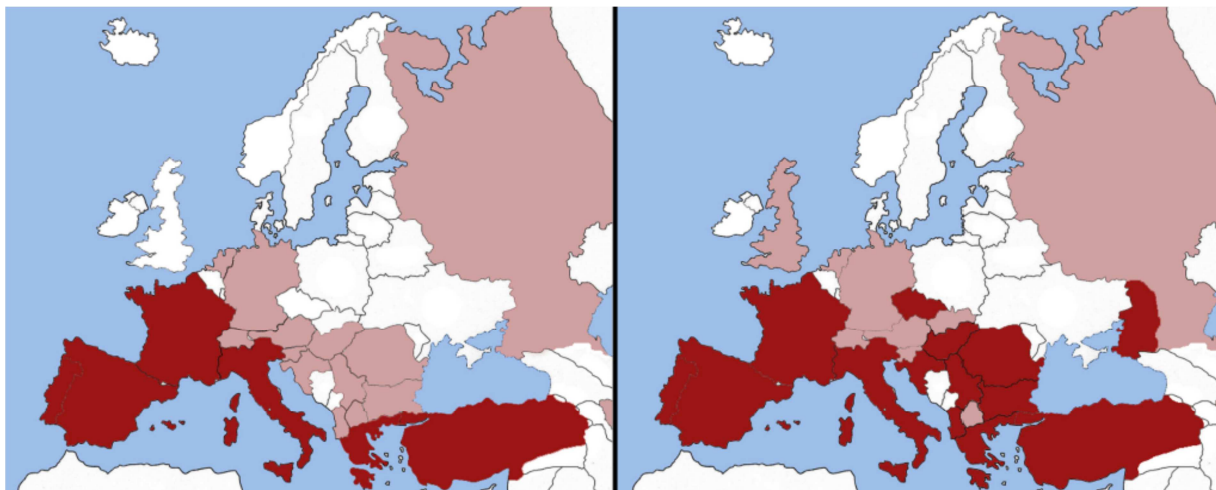
Esta parasitose para além de causar um estado clínico grave e até mesmo colocar em risco a vida do hospedeiro constitui ainda um risco para a população humana. Simón *et al.* (2009) fizeram uma revisão dos casos clínicos humanos relatados até então, e os valores registados foram cerca de 300 casos para a dirofilariose pulmonar (caracterizada pela presença de nódulos pulmonares que podem ser erroneamente considerados como tumores malignos), e 800 casos para a forma subcutânea ou ocular da doença. A maioria dos casos de dirofilariose pulmonar humana foram detectados nos Estados Unidos e no Japão, enquanto na Europa a maioria dos casos referiam-se a lesões subcutâneas ou oculares. Além disso, estes autores acreditam que os casos clínicos são apenas a "ponta do iceberg" no que diz respeito à taxa de infecção, uma vez que estudos serológicos indicaram prevalências em humanos semelhantes às encontradas em cães (Simón *et al.*, 2009; Montoya-Alonso *et al.*, 2010). Todavia, as certezas quanto à espécie responsável por estes quadros clínicos são ainda dúbias. Pampiglione, Rivasi & Gustinelli (2009) reavaliaram 28 casos humanos descritos na literatura científica, 20 casos com lesões pulmonares, cinco subcutâneas, uma subconjuntival e um caso de lesão na gordura retroperitoneal referenciados como causados por *D. immitis*, por *Dirofilaria* spp. ou *D. tenuis* e cujos autores, baseados em critérios morfológicos concluíram que na maioria dos casos, os diagnósticos estavam errados e que o agente patogénico em causa era *D. repens* e não *D. immitis*, colocando em causa o papel zoonótico da última, e salientando a necessidade de confirmação por técnicas moleculares a classificação etiológica, sempre que morfológicamente surjam dúvidas.

Quanto à situação epidemiológica, a dirofilariose é uma doença em expansão. Apesar do esforço feito para prevenir e controlar a infecção em cães, a dirofilariose canina (DCan) continua a apresentar prevalências elevadas em áreas endémicas, e a atingir novas zonas. Como consequência secundária, o número de casos de dirofilariose humana e de felinos infectados são cada vez mais frequentes (Morchón *et al.*, 2012).

Vários factores podem influenciar a propagação da doença, como: a circulação de animais infectados para áreas não endémicas, a introdução de novas espécies de mosquitos capazes de agir como vectores, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global e a actividade humana em novas áreas criando microhabitats favoráveis aos vectores (Genchi *et al.*, 2008a; Morchón *et al.*, 2012).

As alterações na distribuição epidemiológica da DCan na Europa encontram-se ilustradas na figura 9. Nota-se que a doença se alastrou dos países do sul para o Nordeste e para países do centro da Europa.

Figura 9 – Comparação da distribuição geográfica da DCan na Europa em 2001 e em 2011.



Legenda: à esquerda a situação em 2001, à direita as alterações ocorridas entre 2001 e 2011; as áreas endémicas estão representadas a vermelho; as áreas com casos esporádicos representadas a rosa (fonte: Morchón *et al.*, 2012).

5. Importância da dirofilariose na Saúde Pública e Veterinária

A comunidade científica assume que a dirofilariose é um problema que afecta tanto a Saúde Animal (pela sua patogenicidade é de extrema preocupação e importância em medicina veterinária), como a Saúde Pública (pelo seu carácter zoonótico e crescente propagação) (Traversa, Di Cesare & Conboy, 2010b).

Apesar dos esforços globais para promover a sensibilização, incentivar a pesquisa e fornecer directrizes actualizadas para o diagnóstico, tratamento e prevenção desta doença, continua a ser fundamental o papel dos médicos veterinários junto dos proprietários para o estabelecimento de programas de controlo dos vectores, e de protocolos de prevenção adequados às espécies animais afectadas (Simón *et al.*, 2009; Traversa *et al.*, 2010b).

6. Dirofilariose em Portugal

Portugal é considerado uma região endémica para a DCan (Araújo, 1996, citado por Morchón *et al.*, 2012) com prevalências de 2,1% no Norte e Centro-norte do País, 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo e 12% no Algarve (Araújo, 1996; Balreira *et al.*, 2011, citados por Morchón *et al.*, 2012). No entanto, a Ilha da Madeira é a região onde se detectou a maior prevalência, 30% (Araújo, 1996, citado por Morchón *et al.*, 2012).

Recentemente Cardoso *et al.* (2012) realizaram um rastreio serológico testando animais assintomáticos e animais que apresentavam sintomatologia compatível com a DCan. As

prevalências para os respectivos grupos foram: 2,9% e 3,4% para o Norte do país, 0,9% e 7,4% para a região Centro, 2,4% e 5,8% para Lisboa, 4,7% e 14% para o Alentejo, 5,1% e 17,1% para o Algarve, 0% para ambos os grupos de animais dos Açores, e 40% para os cães aparentemente saudáveis da Madeira.

A infecção por *D. immitis* em gatos também tem sido pesquisada. Rosa (2009) obteve uma seroprevalência de 1,43% (1/70) em felinos da RML, Almeida (2010) detectou a presença de antígenos específicos em 1,2% (1/86) dos gatos testados no distrito de Setúbal, enquanto Miranda (2011) obteve uma prevalência de 1,4% (1/72) na Sub-região do Baixo Vouga utilizando a mesma técnica. Vieira *et al.* (2011, citados por Morchón *et al.*, 2012) obtiveram uma seroprevalência de 17,51% em gatos do Norte e Centro do país, pesquisando anticorpos.

Quanto à fauna silvestre, cinco lontras (*Lutra lutra*) foram estudadas tendo-se encontrado *D. immitis* em duas delas (Torres *et al.*, 2004, citados por Morchón *et al.*, 2012).

No que diz respeito à dirofilariose humana, em Portugal foi registado um caso humano de dirofilariose ocular (Rombert *et al.*, 1992, citados por Almeida, 2011).

7. Dirofilariose Felina (DFel)

O primeiro caso de dirofilariose descrito em gatos ocorreu em 1921, no Brasil (Travassos, 1921, citado por Labarthe, Ferreira, Guerrero, Newcomb & Paes-de-Almeida, 1997).

A DFel não é tão comum como a DCan mas o número de casos relatados aumenta a cada ano, e actualmente é reconhecida como uma causa de doença grave em gatos (Venco, Genchi, Genchi, Gatti & Kramer, 2011).

A DFel já foi descrita em países como África do Sul, Austrália, Brasil, Colômbia, Coreia do Sul, Egito, Espanha, Estados Unidos da América, França, Granada, Itália, Japão, Portugal, Tailândia e Ucrânia. Até ao momento, encontram-se descritos 34 casos de DFel (causados por *D. immitis* ou *D. repens*), e nos vários rastreios epidemiológicos realizados as prevalências obtidas variaram de 0 a 61,2 % (Tabela 10 do Anexo III). No entanto é difícil comparar os estudos entre si pois existe uma grande variabilidade não só nas populações rastreadas, mas também nas técnicas de diagnóstico aplicadas.

Apesar dos gatos estarem em risco, em locais onde a infecção canina é endémica, a prevalência de infecção é baixa (5 a 10% da observada em cães). As prevalências menores podem ser justificadas por um certo grau de resistência dos felinos à infecção, o que é reflectido pelo menor número de parasitas que alcançam o estado adulto, e pelo baixo nível e curta duração da microfilarémia (Patton & McCracken, 1991; Prieto *et al.*, 2001; Kramer & Genchi, 2002; Hemmersbach-Miller, Delmont, Hours & Brouqui, 2005; Simón *et al.*, 2009; Venco *et al.*, 2011). Por outro lado, a percepção de um aumento na frequência de infecção em gatos pode ser tanto devido a aperfeiçoamentos nos métodos de diagnóstico, como à sensibilização dos médicos veterinários, ou poderá significar que os gatos estão realmente

mais susceptíveis à infecção por *D. immitis* (Guerrero *et al.*, 1992, citado por Labarthe *et al.*, 1997).

As principais espécies de vectores implicadas na infecção de felinos pertencem ao género *Culex*. Estas espécies apesar de se alimentarem em cães apresentam também uma preferência hemática marcada para a espécie felina (Gomes, Serrão, Duarte, Bendas & Labarthe, 2007; AHS, 2012).

7.1. Fisiopatologia

A importância clínica da dirofilariose é maior em gatos porque mesmo um pequeno número de parasitas pode ser fatal (AHS, 2012).

Em contraste com os cães, os gatos desenvolvem uma forte resposta imunitária caracterizada pela produção de anticorpos IgG contra antígenos de *D. immitis*. Esta resposta é no entanto baixa contra a forma larvar L3 do parasita, permitindo-lhe evadir-se à resposta humoral do hospedeiro e continuar o seu desenvolvimento até à forma adulta, altura em que o sistema imunitário é capaz de impedir a maturação da maioria das larvas e de destruir grande parte dos parasitas adultos (Prieto *et al.*, 2001; Simón *et al.*, 2007).

A infecção por *D. immitis* influencia também a produção de eicosanóides (compostos lipídicos produzidos durante o metabolismo do ácido araquidónico que modulam, localmente, as respostas inflamatórias e imunológicas) intravasculares em gatos. No estudo realizado por Morchón *et al.* (2004), gatos infectados com *D. immitis* apresentaram níveis de prostaglandina E2, tromboxano B2 e leucotrieno B4 significativamente maiores do que em gatos não infectados.

O papel antigénico dos endossimbiontes *Wolbachia* spp. na DFel também tem sido um assunto de interesse para os investigadores. Bazzocchi *et al.*, (2000) relataram a presença de anticorpos IgG contra *D. immitis* e *Wolbachia* spp. em gatos infectados. E no estudo de Morchón *et al.* (2004), a resposta imunitária aos antígenos *Wolbachia* spp. foi detectada logo dois meses após a infecção e mesmo antes da detecção de anticorpos específicos contra antígenos de *D. immitis*. Estes resultados demonstram que a resposta humoral em gatos contra a dirofilariose não é apenas dirigida contra o parasita, mas também contra o endossimbionte. Além disso, estes autores associaram também as alterações no nível de eicosanóides à libertação das bactérias *Wolbachia* spp. aquando da morte dos parasitas. De acordo com estes resultados, pode concluir-se que a bactéria *Wolbachia* spp. também desempenha um papel importante nas reacções inflamatórias da DFel.

Na espécie felina as mudanças fisiopatológicas decorrentes da infecção por dirofilariose podem nunca vir a manifestar-se, mas quando ocorrem, estabelecem-se em dois estágios de doença: a chegada das larvas L5 à vasculatura e, a morte das dirofilárias adultas (Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012).

Cerca de três meses após a infecção os parasitas imaturos chegam às artérias pulmonares e arteríolas levando a uma resposta inflamatória vascular e parenquimatosa aguda, o que pode conduzir à sua morte. Tem sido apoiada a hipótese de que esta reacção se deva à actividade de macrófagos pulmonares intravasculares, e a uma componente do sistema retículo-endotelial existente nos felinos, e que não ocorre em cães. Dillon, Warner, Brawner, Hudson, & Tillson (2008) estudaram a actividade dos macrófagos pulmonares em gatos infectados com *D. immitis* e verificaram que os gatos com parasitas vivos apresentavam uma actividade dos macrófagos muito menor do que gatos com parasitas mortos, o que sugere que os parasitas são capazes de produzir, directa ou indirectamente, um produto que resulta na supressão da actividade destas células. A atenuação da fagocitose diminui o grau de lesão pulmonar, talvez por um efeito anti-inflamatório, propiciando o desenvolvimento das formas adultas (Dillon *et al.*, 2008, AHS, 2012). Esta é a fase inicial da doença diagnosticada muitas vezes como asma ou bronquite alérgica, mas na verdade faz parte da “Doença Respiratória Associada à Dirofilariose” (Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012). As alterações que ocorrem no pulmão destes gatos são evidenciadas pelo exame histopatológico. A lesão que ocorre com maior frequência é a hipertrofia arterial pulmonar oclusiva das pequenas arteríolas pulmonares, contudo este tipo de lesões também já foram identificadas em gatos livres de *D. immitis* pelo que não são patognomónicas (Browne *et al.*, 2005, citados por Lee & Atkins, 2010). As lesões parenquimatosas, nomeadamente a hiperplasia extensiva dos pneumócitos tipo II, também parecem ter um papel importante no desenvolvimento da dificuldade respiratória aguda em gatos (Nelson *et al.*, 2010; Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012).

Embora alguns gatos recuperem dos vários danos, esta fase é muitas vezes fatal podendo ocorrer morte súbita (Nelson *et al.*, 2010).

A segunda fase de doença prende-se com a morte dos parasitas. As dirofilárias mortas ou degeneradas causam um agravamento da inflamação pulmonar e tromboembolismo. Os parasitas adultos apresentam maior probabilidade de obstruir as artérias pulmonares de gatos, comparativamente com os cães, em virtude do seu tamanho relativo. A doença é mais grave nos lobos caudais do pulmão e a obstrução arterial do lobo caudal pode ser causada tanto por proliferações vilosas, como por trombos ou mesmo pela morte de dirofilárias. Por outro lado, a circulação colateral broncopulmonar geralmente é suficiente para prevenir o enfarte do pulmão (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

Uma vez que as infecções por *D. immitis* em gatos são geralmente compostas por um pequeno número de parasitas, e de duração relativamente curta, as lesões tendem a ser focais, não causando, ao contrário do observado na DCan, obstrução suficiente para produzir hipertensão pulmonar clínica. Logo, a hipertrofia do ventrículo direito e a insuficiência cardíaca direita, assim como a ocorrência da Síndrome da Veia Cava resultante da deslocação de um elevado número de dirofilárias para as veias cavas e para a junção

atrioventricular direita, são incomuns na DFel (Genchi *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

7.2. Sinais Clínicos

Muitos gatos toleram a infecção por *D. immitis* sem apresentarem quaisquer sinais clínicos. Contudo, quando ocorrem os sinais são variáveis, transitórios e inespecíficos pelo que um diagnóstico baseado na sintomatologia é muito difícil (AHS, 2012).

Os sinais clínicos associados à DFel compreendem, predominantemente, manifestações respiratórias e gastrointestinais, ou, ocasionalmente, sinais neurológicos, crónicos ou agudos. Os sinais de doença respiratória crónica, como taquipneia persistente, tosse intermitente e dispneia, são os mais comuns. A anorexia, letargia e perda de peso podem ocorrer em alguns casos. A ocorrência de episódios de vômito intermitente, alimentar ou espumoso, normalmente não relacionado à alimentação, pode ser o único sinal apresentado. Outras anormalidades, como ascite, hidrotórax, quilotórax, pneumotórax, ataxia, cegueira, convulsões e síncope foram relatadas, mas são incomuns. O aparecimento súbito de sinais neurológicos, com ou sem anorexia e letargia ocorre durante a migração errante dos parasitas e raramente coexistem sinais cardiopulmonares e neurológicos (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012).

A morte súbita em gatos infectados com *D. immitis* tem sido atribuída ao colapso circulatório, à insuficiência respiratória por enfarte arterial pulmonar agudo (causado pelo tromboembolismo resultante da morte das dirofilárias adultas), à reacção anafiláctica causada pela morte do parasita; e/ou por hipertensão pulmonar (Dilon, 1984, Lok & Knight, 1998, Dvorak, 2000, citados por Litster, Atkins & Atwell, 2008).

7.3. Factores de risco

Relativamente aos factores intrínsecos ao hospedeiro, como o sexo, a idade, a raça e pelagem ainda não existe muita informação para a espécie felina. Alguns estudos clínicos e dados obtidos a partir de gatos experimentalmente infectados apontam para uma discreta predominância de infecção em gatos machos (McCall *et al.*, 1992, Guerrero *et al.*, 1992, citados por Kramer & Genchi, 2002; Kramer & Genchi 2002), contudo esta predisposição não foi verificada em outros casos de exposição natural (Liu *et al.*, 2005; AHS, 2012).

Quanto à idade, não parece existir uma faixa etária mais propícia para a ocorrência de infecção, e esta já foi detectada em gatos desde os nove meses até aos 17 anos, apesar da idade média apontada para a altura de diagnóstico corresponde aos 4 anos, idade que corresponde também à idade média para a altura da morte (AHS, 2012). Contudo, Liu *et al.* (2005) encontraram uma diferença nos seus estudos, em que gatos mais velhos (> de 6 anos) mostraram uma maior prevalência para a infecção por *D. immitis*.

Os gatos domésticos de pêlo curto parecem estar mais predispostos (Nelson *et al.*, 2010). Relativamente aos factores extrínsecos como o estilo de vida, seria suposto que gatos que vivem predominantemente ao ar livre ou que apresentam um estilo de vida tanto no interior como no exterior estivessem em maior risco de infecção do que aqueles que vivem exclusivamente dentro de casa, e apresentassem prevalências superiores, no entanto nos estudos realizados por Atkins (1997) e Atkins *et al.* (2000, citados por Kramer & Genchi, 2002), um estilo de vida interior não protege os gatos da infecção.

8. Diagnóstico

O diagnóstico da DFel torna-se difícil pelo fraco nível de suspeição por parte dos clínicos, atendendo à sintomatologia muitas vezes inespecífica, ou até mesmo pela inexistência de sinais clínicos.

Apesar da auscultação por vezes revelar anomalias tais como: sopro cardíaco sistólico (quando os gatos apresentam parasitas adultos na junção atrioventricular direita por interferirem na função da válvula tricúspide); crepitações pulmonares; e murmúrios pulmonares abafados (tanto da consolidação pulmonar quanto no derrame pleural) é impossível chegar a um diagnóstico definitivo sem a realização de exames mais específicos (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). O plano de diagnóstico normalmente inclui uma combinação de testes serológicos, radiografias torácicas e ecocardiogramas (Nelson *et al.*, 2010).

A existência de um teste específico e sensível para o diagnóstico da infecção seria muito útil para o tratamento clínico de gatos infectados e para uma melhor compreensão da doença (Prieto *et al.*, 1997).

8.1. Diagnóstico etiológico

8.1.1. Testes serológicos

Os testes de detecção de antígenos ou de pesquisa de anticorpos anti-*Dirofilaria* são ferramentas muito úteis, e quando usadas em conjunto aumentam a probabilidade de um diagnóstico correcto (Berdolay *et al.*, 2004; Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012).

a) Testes para a detecção de antígenos

Estes testes baseados na reacção de ELISA permitem a pesquisa de antígenos específicos encontrados principalmente em parasitas adultos do sexo feminino (provenientes dos órgãos reprodutores) (Atkins, 1999, Snyder *et al.*, 2000, citados por Carleton & Tolbert, 2004; Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). Estes testes são altamente específicos para detecção da infecção por dirofilárias adultas, mas a sua sensibilidade depende do teste e da idade e número de parasitas (Nelson *et al.*, 2010) variando entre 68-86% (Levy, 2007, citado por

Venco *et al.*, 2011). A sensibilidade dos testes de antígenos comerciais tem vindo a aumentar, permitindo detectar infecções com apenas um parasita adulto fêmea (como observado em 50 a 70% dos gatos infectados), embora as infecções por um único sexo, nomeadamente por machos, ou apenas por formas imaturas, sejam indetectáveis pelos testes actualmente disponíveis (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). Outra das limitações da detecção antigénica prende-se com o período de migração do parasita no hospedeiro felino, pelo que os resultados serão negativos durante os primeiros cinco meses após a infecção e podem ser variavelmente positivos entre os seis e os sete meses. É justamente por isso que em casos agudos, podem manifestar-se sinais clínicos graves ou ocorrer morte súbita em gatos com testes negativos. Por outro lado, a morte espontânea dos parasitas com persistência de antígenos por algumas semanas, e infecções ectópicas podem levar a resultados positivos mas em que nenhum parasita é encontrado na necropsia (Nelson *et al.*, 2010; Venco *et al.*, 2011; AHS, 2012).

Para além dos antígenos do aparelho reprodutor das fêmeas outros antígenos de parasitas adultos têm sido alvo de estudo, de modo a permitirem a diferenciação de infecção activa e infecção antiga (Prieto *et al.*, 1997; Prieto, Simón, Genchi, McCall & Venco, 1999; Prieto, Ceciliani, Venco, Morchón, & Simón, 2002).

b) Testes para a detecção de anticorpos

Os testes de detecção de anticorpos detectam a resposta imunitária do hospedeiro contra o parasita. Os testes de ELISA utilizam antígenos recombinantes, ou antígenos extraídos e purificados de parasitas machos e fêmeas, e estão disponíveis em clínicas veterinárias e em laboratórios de referência (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012). Estes testes podem ser utilizados na triagem da DFel, uma vez que em gatos, a resposta do sistema imunitário à infecção por *D. immitis* traduz-se numa forte produção de anticorpos IgG contra os antígenos do parasita (Prieto *et al.*, 2001, Nelson *et al.*, 2010). Um resultado positivo indica apenas exposição ao parasita, não fazendo a distinção entre uma infecção passada ou actual, ou que estejam presentes parasitas adultos especificamente, pelo que deve ser confirmado por outro método, para que haja garantias de um diagnóstico definitivo (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012).

A concentração de anticorpos não parece estar correlacionada com a carga parasitária, nem com a gravidade da doença clínica ou com os sinais radiográficos, embora altos títulos de anticorpos tenham sido associados tanto à morte dos parasitas quanto a infecções maciças. No entanto, gatos com sintomatologia apresentam maior probabilidade de serem positivos, relativamente aos assintomáticos. O tempo de circulação dos anticorpos após a eliminação da infecção é incerto, mas vão diminuindo durante semanas ou meses até deixarem de ser detectados (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

Estes testes apresentam uma sensibilidade superior aos testes com antígenos, pois parasitas de qualquer sexo e em qualquer etapa do seu desenvolvimento podem provocar uma resposta imunitária, assim, os anticorpos podem ser detectados precocemente, cerca de 60 dias após a infecção (Kramer & Genchi, 2002; Nelson *et al.*, 2010). Contudo, a especificidade destes testes varia entre os 78% a 99%, já que existe a possibilidade de ocorrerem reacções cruzadas com outros parasitas, como por exemplo nemátodes intestinais (*Toxocara cati*) e nemátodes pulmonares como o *Aelurostrongylus abstrusus* (Levy, 2007, citado por Venco *et al.*, 2011; Genchi *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2010). Quanto a resultados falso-negativos, estes podem ocorrer entre os 14% e 25% dos casos (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012) estando normalmente associados a infecções por um único parasita. Sendo assim, um teste negativo pode significar que o gato: (i) não se encontra infectado; (ii) se encontra infectado há menos de 60 dias; ou (iii) que o animal produziu anticorpos mas em quantidades muito baixas para serem detectadas. Se houver suspeita clínica de DFel mas o teste de anticorpos for negativo, pode-se testar outro anticorpo ou um teste de pesquisa de antígenos, bem como proceder à realização de exames imagiológicos (Nelson *et al.*, 2010).

8.1.2. Testes para detecção de microfilárias

Os testes utilizados para a pesquisa de microfilárias não são comumente usados para a identificação da DFel uma vez que a microfilarémia é curta e transitória e pode nunca chegar a ocorrer se não houver maturação das larvas ou se a infecção for unissexual. Assim sendo a sua sensibilidade é baixa originando um elevado número de falsos negativos (Lee & Atkins, 2010; AHS, 2012).

As microfilárias podem ser visualizadas por observação de um esfregaço sanguíneo a fresco ou por técnicas de concentração como a técnica da concentração modificada de Knott. O teste de Knott assim como a técnica de coloração da fosfatase ácida permitem a diferenciação de *D. immitis* de outras larvas tais como *D. repens* ou *Acanthocheilium* (antiga *Diptalonia*) *reconditum* (Nelson *et al.*, 2010).

8.1.3. Técnicas moleculares

As técnicas moleculares como é o caso da técnica de PCR representam uma importante alternativa para o diagnóstico específico de nemátodes filariais em gatos, e podem ser usadas não só para diagnóstico, mas também para a diferenciação de espécies (Liu *et al.*, 2005; Nuchprayoon *et al.*, 2006; Traversa *et al.*, 2010a).

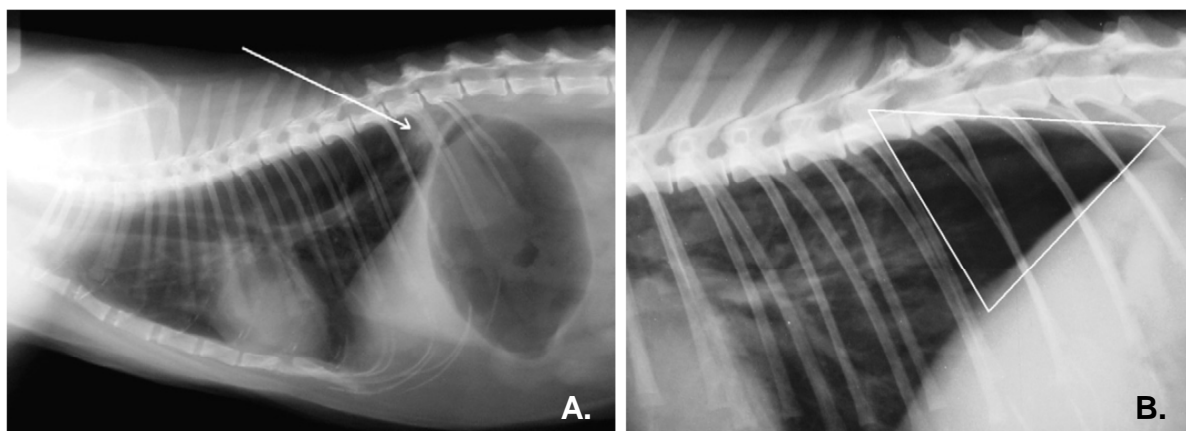
8.2. Diagnóstico imagiológico

8.2.1. Radiologia

Independentemente da sintomatologia, ou dos resultados de testes serológicos, a radiografia torácica pode fornecer fortes evidências de infecção por *D. immitis* em gatos, e é importante não só para avaliar a gravidade da doença como também para monitorizar a sua progressão ou regressão, e definir um prognóstico (Genchi *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012). Contudo, é necessário ter em conta que uma pequena percentagem de gatos com dirofilariose não apresenta alterações radiográficas, pelo que este exame não deve ser usado como critério de exclusão para o diagnóstico da DFel (Nelson *et al.*, 2010).

As alterações radiográficas sugestivas de infecção incluem o alargamento do tronco principal da artéria pulmonar, tortuosidades das artérias pulmonares, que surgem com margens pouco definidas, um grau variável de alterações no parênquima pulmonar por infiltrados broncointersticiais difusos ou focais, e menos comumente, hiperinflação dos pulmões com achatamento do diafragma, aumento da silhueta cardíaca, derrame pleural e pneumotórax (Lewis, 1986, citado por Labarthe *et al.*, 1997; Selcer *et al.*, 1996, citados por Venco *et al.*, 2008 a; Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012) (Fig.10).

Figura 10 – Aspectos radiográficos de gatos acometidos por dirofilariose.



Legenda: **A** – Radiografia torácica de um gato com um padrão broncointersticial focal e irregular (seta); **B** – Ampliação de uma radiografia torácica de um felino demonstrando anormalidades vasculares: o corte abrupto das artérias pulmonares (triângulo branco) é sugestivo de tromboembolismo (fonte: Venco *et al.*, 2008a).

As alterações na artéria pulmonar e no coração direito são tipicamente mais subtis em gatos do que em cães. A distensão da artéria pulmonar pode ser maior nos primeiros sete meses de infecção, podendo depois ocorrer alguma redução, especialmente nas artérias craniais. A posição dorsoventral é a melhor para a avaliação das artérias dos lobos caudais (frequentemente mais afectados). Apesar da artéria do lobo caudal direito poder estar mais proeminente, o critério radiográfico mais sensível para separar gatos infectados de animais

não infectados é a observação da distensão da artéria do lobo caudal esquerdo maior ou igual a 1,6 da largura da nona costela (Genchi *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, AHS, 2012).

É ainda de salientar que cerca de metade dos gatos com um alargamento arterial pulmonar são positivos em teste de pesquisa de anticorpos. As discrepâncias que por vezes surgem entre os resultados clínicos, serológicos e radiográficos devem-se a diferenças temporais no desenvolvimento do parasita, à resposta imunitária do hospedeiro e reacções inflamatórias, bem como à regressão espontânea das lesões (AHS, 2012).

8.2.2. Angiografia

A angiografia pulmonar é um método simples que pode confirmar um diagnóstico provável de DFel, contudo dada a sua natureza invasiva não é amplamente utilizada. Este método permite avaliar o tamanho e a morfologia das artérias pulmonares, pelo que se forem detectadas alterações morfológicas e ressaltados defeitos de preenchimento filiformes lineares, o grau de suspeição é muito maior. Este método é útil em casos de suspeita clínica mas com testes de pesquisa de antígenos negativos e ecocardiograma sem alterações (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

8.2.3. Ecocardiograma

A ecocardiografia é uma ferramenta útil no diagnóstico de DFel com elevada sensibilidade e especificidade (Venco *et al.*, 1998, De Francesco *et al.*, 2001, citados por Venco *et al.*, 2011; AHS, 2012).

Em gatos os dados ecocardiográficos podem ser normais, a menos que os parasitas estejam localizados no coração, no segmento principal da artéria pulmonar ou nas artérias pulmonares proximais. Como os parasitas encontram-se mais comumente alojados nas artérias pulmonares do que na câmara direita do coração, é importante que seja feita uma pesquisa cuidadosa destas estruturas (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012). Por outro lado, quanto maior o número de parasitas, maior a probabilidade de serem visualizados pelo ecocardiograma. A cutícula das dirofilarias adultas é bastante ecogénica, produzindo imagens de duas linhas paralelas (Fig.11), no caso dos parasitas vivos, ou duas linhas colapsadas em parasitas mortos (Badertscher *et al.*, 1988, citado por Venco *et al.*, 2011; AHS, 2012). Contudo, a quantificação da carga parasitária é difícil atendo à disposição do corpo do parasita que pode ser transecionado mais que uma vez consoante a imagem ecográfica, sendo frequente a sobrestimação do número de vermes por este método (AHS, 2012).

Figura 11 – Aspecto de uma ecocardiografia de um gato fortemente infectado por *D. immitis*.



Legenda: Ecocardiograma mostrando a presença de parasitas adultos (setas) aparecendo sob a forma de linhas paralelas hiperecóticas; RV: ventrículo direito; RA: átrio direito; LV: ventrículo Esquerdo (fonte: Atkins *et al.*, 2008).

8.3. Outros exames

Muitas vezes são realizados também exames laboratoriais gerais, que no caso de gatos infectados têm revelado anemia regenerativa em cerca de um terço dos animais, eosinofilia intermitente (mais frequente entre os 4 e 7 meses após infecção) e basofilia (sendo o parâmetro mais consistente para suspeita de DFel). No caso de doença arterial pulmonar avançada e tromboembolismo pode ser detectado neutrofilia (algumas vezes com desvio à esquerda), monocitose, trombocitopénia e coagulação intravascular disseminada (CID) (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). A hiperglobulinémia é a alteração bioquímica mais frequente (Nelson *et al.*, 2010).

Amostras recolhidas por lavagem broncoalveolar ou traqueal podem revelar um exsudado eosinofílico sugestivo de doença alérgica ou parasitária, semelhante ao encontrado na asma ou em outras infecções parasitárias pulmonares. Normalmente estas alterações ocorrem entre 4-8 meses após infecção, mas numa fase mais avançada da doença as amostras obtidas são menos relevantes correspondendo a uma inflamação crónica inespecífica. Quando ocorre insuficiência cardíaca congestiva (ICC) secundária induzida pelo parasitismo, o derrame pleural resultante geralmente é um transudato modificado, embora ocasionalmente possa ser identificado como quilotórax (Nelson *et al.*, 2010).

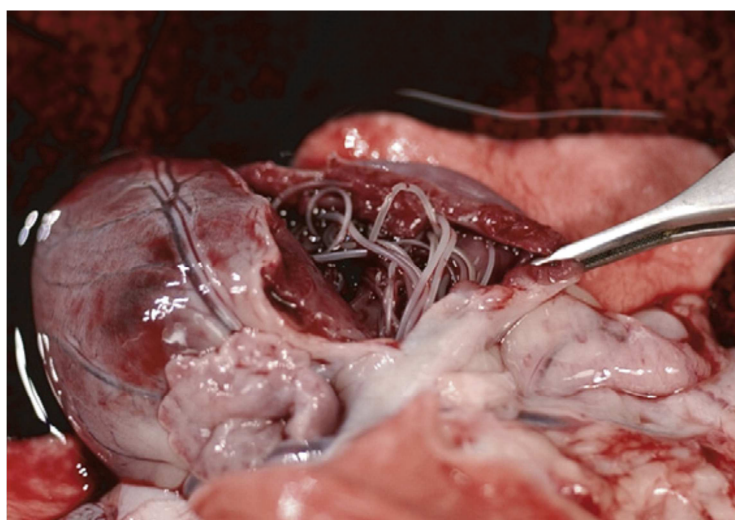
Normalmente o electrocardiograma (ECG) de gatos infectados por dirofilarias não apresenta alterações, a não ser que estes animais desenvolvam ICC secundária à dirofilariose, nestes casos as alterações apresentadas (tais como taquiritmias) são sugestivas de um aumento do ventrículo direito (Nelson *et al.*, 2010).

8.4. Confirmação por necropsia

Por vezes o diagnóstico em vida de DFel é complicado e em situações em que ocorre morte súbita inexplicável, a necropsia deveria ser realizada para a confirmação da infecção (AHS, 2012).

A necropsia (Fig.12) tem sido considerada um método de referência para o diagnóstico pós-morte, contudo a dissecação e inspecção exaustiva do coração e dos pulmões (veia cava caudal, átrio e ventrículo direitos, artérias pulmonares e do tecido pulmonar em estreita associação com artérias pulmonares) é insensível para infecções com formas imaturas, assim como para as infecções ectópicas, sendo também mais difícil em infecções com um pequeno número de parasitas, ou com parasitas mortos e seus fragmentos (Carleton & Tolbert, 2004; Levy *et al.*, 2007; McCall *et al.*, 1992, 1995; Genchi *et al.*, 1998b, citados por Venco *et al.*, 2011).

Figura 12 – Imagem da necrópsia do gato correspondente ao ecocardiograma da Fig. 11.



Legenda: Átrio e ventrículo direitos do coração abertos exibindo vários parasitas adultos de *D. immitis* (fonte: Atkins *et al.*, 2008).

A Tabela 2 pretende resumir os principais procedimentos usados no diagnóstico de DFel e a sua interpretação (AHS, 2012).

Tabela 2 – Interpretação dos meios de diagnóstico empregues para a detecção de infecção por *D. immitis*.

Teste	Breve Descrição	Resultados	Interpretação	Limitações
Teste de detecção de Anticorpos	Detecta os anticorpos felinos produzidos em resposta à presença do parasita tão cedo quanto 8 semanas após a transmissão pelo mosquito.	Negativo	Baixo índice de suspeição	Os anticorpos confirmam a exposição ao parasita mas não confirmam a presença de doença.
		Positivo	Aumenta o índice de suspeição; 50% ou mais dos gatos com anticorpos têm doença arterial pulmonar; confirma que o gato está em risco.	
Teste de detecção de Antígenos	Detecta a produção de antígenos produzidos pelo parasita adulto fêmea ou fêmeas.	Negativo	Baixo índice de suspeição	Infecções por parasitas imaturos ou apenas por machos raramente são detectadas.
		Positivo	Confirma a presença de parasitas	
Radiografia Torácica	Detecta o alargamento vascular (inflamação causada pela L5 imatura) e, mais tarde a hipertrofia, a inflamação do parênquima pulmonar e edema.	Normal	Baixo índice de suspeição	Os sinais radiográficos são subjectivos e afectados pela interpretação clínica.
		Sinais consistentes dom DFel	Artérias dilatadas aumentam o índice de suspeição	
Ecocardiografia	Detecta as paredes ecogénicas do parasita imaturo ou maduro residente no lúmen da árvore arterial pulmonar.	Não há visualização de parasitas	O índice de suspeição não é alterado	A taxa de precisão é afectada pela experiência do indivíduo clínico.
		Visualização de parasitas	Confirma a presença do parasita na estrutura observada	

9. Diagnósticos diferenciais

Todas as doenças que apresentem sinais clínicos a nível respiratório, semelhantes aos observados na DFel, tais como asma felina, a cardiomiopatia, a pneumonia (bacteriana, viral, fúngica ou por protozoários), as neoplasias pulmonares (primárias ou metastáticas) e as infecções por *Aelurostrongylus abstrusus* devem constar da lista de diagnósticos

diferenciais (Kramer & Genchi, 2002; Venco *et al.*, 2008a; Traversa 2010b; Lee & Atkins, 2010; Almeida, 2010).

10. Tratamento

O tratamento de gatos infectados com *D. immitis* é discutível e por vezes pode mesmo ser desaconselhado (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012). Se o animal não apresentar sinais clínicos evidentes de infecção, mas existirem evidências radiológicas compatíveis com a doença, pode ser prudente esperar, pois se se tratar de um caso de DFel as lesões podem regredir e o animal pode alcançar a cura espontânea. Contudo, é aconselhável realizar um acompanhamento periódico e avaliar se a infecção se mantém subclínica. Podem ser realizadas novas radiografias torácicas, ecocardiografias, testes de detecção de anticorpos e testes de detecção de antígenos em intervalos de 6 a 12 meses. Os casos de regressão dos sinais radiográficos e, especialmente de seroconversão de um teste antigénico positivo para negativo, provam que o animal recuperou e que o período de risco provavelmente terminou (Nelson *et al.*, 2010; AHS, 2012).

10.1.Tratamento médico

As opções de tratamento são mais limitadas em gatos em comparação com os cães. A terapia adulticida não é recomendada na maioria dos casos de DFel atendendo ao elevado risco de complicações graves para esta espécie (tromboembolismo e choque anafilático, por vezes fatais), sendo portanto comum, uma abordagem mais conservadora e paliativa (Lee & Atkins, 2010; Nelson *et al.*, 2010).

10.1.1. Tratamento sintomático de suporte

Os gatos com sinais clínicos e, com testes serológicos positivos ou com evidência radiográfica de doença pulmonar, podem beneficiar da administração de corticosteróides (Lee & Atkins, 2010; Nelson *et al.*, 2010). A administração de doses anti-inflamatórias de Prednisolona, por via oral, em doses decrescentes (2 mg/kg/dia reduzindo-se gradativamente, durante duas semanas até à dose de 0.5 mg/kg, por mais duas semanas, em dias alternados) ajuda a reduzir os infiltrados intersticiais evidenciados pelas radiografias, podendo a terapêutica ser periodicamente repetida se houver recorrência dos sinais respiratórios. A avaliação da eficácia do tratamento é feita com base nas melhorias da resposta clínica e nas radiografias torácicas do animal (Atkins *et al.*, 1995 citados por Genchi *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

No entanto, em casos agudos ou de choque pela morte dos parasitas e/ou tromboembolia, os gatos devem ser submetidos a terapia de suporte através da administração intravenosa de corticosteróides, fluidoterapia, broncodilatadores e oxigénio. A possibilidade de morte

súbita deve estar sempre presente pelo seu carácter imprevisível, mas uma intervenção rápida é normalmente bem-sucedida e resulta na estabilização do paciente (Litster *et al.*, 2008, Nelson *et al.*, 2010).

Em casos raros de desenvolvimento de ICC deve ser prescrita uma terapia direccionada para controlar a falência cardíaca e os seus sinais. A toracocentese pode ser necessária, assim como o confinamento, a oxigenioterapia, e a administração de Furosemida. A adição de um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) pode ser útil (Nelson *et al.*, 2010).

10.1.2. Tratamento adulticida

A Tiacetarsamida não é recomendada no tratamento adulticida pois estima-se que um terço dos gatos tratados venha a apresentar complicações tromboembólicas, risco que pode ser ainda maior em animais com elevada carga parasitária (Nelson *et al.*, 2010). Por outro lado, gatos tratados com este fármaco não apresentaram sobrevida maior relativamente a gatos que não receberam qualquer tratamento adulticida (Atkins *et al.*, 2000 citado por Nelson *et al.*, 2010).

A Melarsomina também não é recomendada no tratamento da DFel pela insuficiente experiência clínica e pela elevada toxicidade observada em gatos tratados com este composto (Traversa *et al.*, 2010b; Nelson *et al.*, 2010).

A Ivermectina administrada mensalmente, na dose de 24 mg/kg, durante dois anos mostrou uma redução de 65% do número de parasitas adultos (Guerrero *et al.*, 2002, citados por Traversa *et al.*, 2010b).

Apesar do tratamento adulticida ser considerado de último recurso poderá ser utilizado nos casos em que os gatos, apesar de estáveis, continuem a manifestar sintomatologia (Morchón *et al.*, 2004; Lee & Atkins; 2010; AHS, 2012). De facto, já foram descritos, casos de sucesso terapêutico, após administração intravenosa de Tiacetarsamida (2.2 mg/kg BID durante dois dias), combinado com Prednisolona e com uma monitorização intensiva durante duas semanas (Nelson *et al.*, 2010).

10.1.3. Tratamento microfilaricida

O tratamento microfilaricida raramente é necessário uma vez que a microfilarémia em gatos é transitória e breve. Contudo podem ser administrados mensalmente microfilaricidas como a Ivermectina (24 µg/kg PO) e a Milbemicina (2 mg/kg PO), e embora não tenham essa indicação terapêutica podem ser eficazes. Ao contrário da morte dos parasitas adultos, a morte das microfíliarias não parece ser preocupante mesmo em infecções maciças (Lee & Atkins, 2010, Nelson *et al.*, 2010).

10.1.4. Tratamento anti-*Wolbachia*

Apesar da administração de fármacos que visem a eliminação da *Wolbachia* spp. como terapia adjuvante da DFel ser discutível, as tetraciclinas (principalmente a Doxiciclina) têm sido apontadas como eficazes na destruição destas bactérias (Bandi *et al.*, 1999, citados por Labarthe & Guerrero, 2005).

10.2. Tratamento cirúrgico

A remoção cirúrgica de adultos de *D. immitis*, embora seja tecnicamente muito desafiante (Glaus *et al.*, 1995, Lee & Atkins, 2010) é um método mais seguro do que a terapia parasitocida no paciente felino, e mesmo que não seja possível retirar todos os parasitas, é uma alternativa razoável, nos gatos com elevadas cargas parasitárias e em estado crítico, estando também indicada nos casos da Síndrome da Veia Cava.

No entanto a opção cirúrgica também implica uma série de riscos tais como hemorragias, choque anafilático (provocado pelos parasitas durante a extração) e morte (Lee & Atkins, 2010). O tratamento pré-cirúrgico com glucocorticóides e com um anti-histamínico tem sido sugerido, e embora não se saiba se o pré-tratamento com heparina por vários dias possa reduzir o risco de tromboembolismo associado com a remoção cirúrgica dos parasitas, esta tem sido administrada por alguns clínicos (Glaus, 1995; Iizuka *et al.*, 2008).

10.3. Monitorização dos gatos infectados

A monitorização da infecção através da repetição dos testes serológicos a cada 4-6 meses deve ser realizada tanto nos animais assintomáticos como nos gatos que tenham recebido tratamento adúlticida ou cirúrgico (Nelson *et al.*, 2010). Nos animais com doença pulmonar ou nos casos em que os parasitas tenham sido observados por ecocardiograma, a realização de radiografias e ecocardiografias periódicas poderá também ser útil para controlar o curso da infecção (AHS, 2012).

O período de acompanhamento dos gatos infectados com dirofilariose é imprevisível dependendo da resposta individual (Kramer & Genchi, 2002). Apesar de Atkins *et al.* (2000, citados por Kramer & Genchi, 2002) relatarem que o período de sobrevivência dos gatos após o diagnóstico não ser maior de um ano e meio, Venco *et al.* (2008a; 2011) verificaram que a maioria dos animais infectados sobreviveram mais de 3 anos.

10.4. Prognóstico

O prognóstico para qualquer gato infectado com *D. immitis* deve ser considerado reservado (Venco *et al.*, 2008 a). Apesar de mais de 79% dos animais assintomáticos, e uma percentagem mais pequena de gatos com sinais clínicos alcançarem a cura espontânea, a

morte súbita após o início da sintomatologia tem sido relatada em até 21% dos gatos com DFel (Venco *et al.*, 2008a; Genchi *et al.*, 2008).

A probabilidade da ocorrência de morte aumenta significativamente com a idade do animal aquando o diagnóstico (Genchi *et al.*, 2008). Porém, não se detectaram associações significativas com o sexo dos animais, com o tempo de sobrevivência após o diagnóstico ou com a presença/ausência de sinais clínicos.

11. Profilaxia

11.1. Controlo dos vectores

Sendo a dirofilariose uma doença transmitida por vectores culicídeos, o controlo das populações de mosquitos é uma etapa fundamental para a sua prevenção.

Algumas das medidas usadas contra as larvas dos vectores culicídeos incluem: (i) a eliminação ou redução dos criadouros (e.g. drenagem), o que nem sempre é praticável, económico ou aceitável; (ii) o controlo biológico pela introdução de peixes predatórios; e (iii) o controlo químico pela aplicação continuada de insecticidas nos locais de reprodução (Urquhart *et al.*, 1996; Ledesma & Harrington, 2011).

11.2. Protecção dos hospedeiros vertebrados

As principais medidas de profilaxia individuais consistem na utilização de redes mosquiteiras para a protecção das habitações, repelentes e insecticidas (Urquhart *et al.*, 1996; Ledesma & Harrington, 2011).

A quimioprofilaxia para a dirofilariose é recomendada no caso de gatos residentes em áreas endémicas (Kramer & Genchi, 2002, Nelson *et al.*, 2010).

A realização de um teste de pesquisa de antígenos é recomendada antes de se iniciar a profilaxia, no entanto, os produtos profiláticos podem ser administrados mesmo em gatos seropositivos (Nelson *et al.*, 2010, AHS, 2012).

A terapêutica preventiva é recomendada para todos os gatos com mais de oito semanas de idade, que vivam em áreas endémicas, com administrações mensais, durante o período sazonal de transmissão desta doença, começando dentro de 30 dias após o início estimado do período de transmissão, e a última dose deve ser administrada no mês imediatamente a seguir ao esperado fim de transmissão. A administração de agentes preventivos durante todo o ano também tem sido sugerida de modo a aumentar o grau de compromisso por parte dos proprietários (AHS, 2012).

As Lactonas macrocíclicas (Tabela 3) têm sido utilizadas na profilaxia da DFel uma vez que são fármacos seguros e eficazes na maioria dos gatos (AHS, 2012). Existem formulações orais (Ivermectina e Milbemicina oxima) e tópicas (Selamectina e Moxidectina) capazes de

actuar no ciclo biológico do parasita entre a fase larvar L3 e a produção de microfírias (Nelson *et al.*, 2010; Ledesma & Harrington, 2011).

Tabela 3 – Produtos profiláticos usados na prevenção de DFel.

Produto	Dose e Via de administração	Periodicidade	Observações
Ivermectina (Heartgard®)	24 µg/kg PO	Mensal	
Milbemicina oxima (Milbemax®)	2 mg/kg PO	Mensal	Eficácia de 100% comprovada experimentalmente (Genchi <i>et al.</i> , 2004); esta formulação contém praziquantel, mas esta molécula não é activa contra <i>D. immitis</i> (Andrews <i>et al.</i> , 1983, citado por Genchi <i>et al.</i> , 2004).
Selamectina (Stronghold®)	6 mg/kg, tópica	Mensal	Eficácia de 100% comprovada experimentalmente, mesmo com a realização de banhos 24 horas após o tratamento (McTier <i>et al.</i> , 2000, citado por Fisher & Shnaks 2008).
Moxidectina 1%, Imidaclopride 10% (Advocate®)	1mg/kg, tópica	Mensal	Eficácia de 100% na prevenção de infecções naturais e experimentais (Arther <i>et al.</i> , 2003, 2005; Venco <i>et al.</i> , 2008); a formulação contém Imidaclopride que não tem actividade contra <i>D. immitis</i> (Arther <i>et al.</i> , 2003).

12. Perspectivas futuras para o diagnóstico, tratamento e profilaxia da DFel

Bazzocchi *et al.* (2000) sugeriram a utilização de testes para a detecção de anticorpos anti-*Wolbachia* como método adjuvante no diagnóstico de DFel, uma vez que estas bactérias estão presentes em todas as fases larvares de *D. immitis*. Por outro lado, o tratamento dos endossimbiontes poderá ajudar na eliminação dos parasitas (Lee & Atkins, 2010).

Por fim, e apesar de não haver até ao momento nenhuma vacina comercializada, as últimas investigações sobre o genoma e proteoma de *Dirofilaria* spp. e *Wolbachia* spp. poderão levar ao desenvolvimento de potenciais vacinas baseadas no uso combinado de antígenos provenientes dos parasitas e dos endossimbiontes (Simón *et al.* 2009).

CAPÍTULO III – A IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. E *DIROFILARIA IMMITIS* EM GATOS NA REGIÃO DE OLHÃO

Objectivos

O presente trabalho teve como objectivos principais:

- a) Determinar a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. e por *Dirofilaria immitis* numa amostra da população felina (gatos errantes e domésticos) da região de Olhão;
- b) A divulgação de informação sobre estas parasitoses e sensibilização de proprietários e médicos-veterinários;
- c) Adicionalmente, a determinação de possíveis factores de risco inerentes às mesmas (pela recolha de alguns dados epidemiológicos incluindo idade, sexo, raça, estilo de vida, contacto com outros animais, deslocações, desparasitações, vacinas, sinais clínicos e doenças concomitantes);

Materiais e Métodos

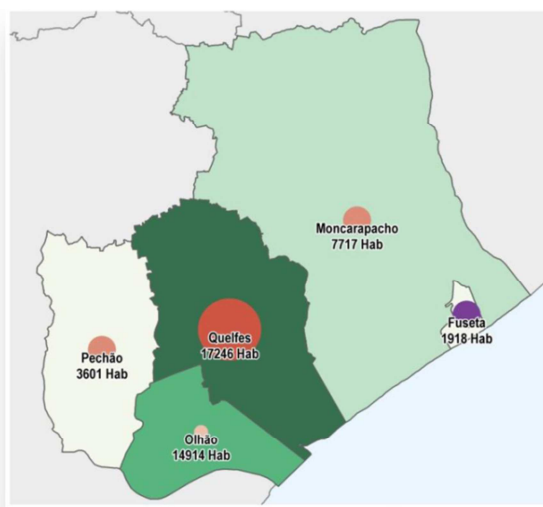
Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Todos os proprietários dos animais, bem como, os responsáveis dos gatis/sociedades protectoras aderentes foram informados do estudo e das técnicas a executar em cada animal, tendo sido a participação dos gatos, autorizada pela assinatura de um consentimento informado.

1. Caracterização da área geográfica do estudo

O Município de Olhão situa-se, geograficamente, no Sotavento Algarvio, apresentando uma área territorial com cerca de 130km². É confrontado a este e a norte pelo concelho de Tavira, a oeste pelo concelho de Faro, e a sul pelo Oceano Atlântico. Este concelho pertence ao distrito de Faro e apresenta-se dividido em 5 freguesias: Olhão, Fuzeta, Moncarapacho, Pechão e Quelfes (Fig. 13). Segundo os valores dos censos de 2011, apresenta uma população de 45396 habitantes, correspondente a uma densidade populacional de 346,83 hab./Km², valor que

Figura 13 – Município de Olhão.

(fonte: CMO, 2012).



pode oscilar atendendo ao turismo da região (Câmara Municipal de Olhão, 2012).

O concelho de Olhão insere-se nas sub-regiões morfológicas do Barrocal, maioritariamente, e do Litoral, e no que se refere à altitude, esta região apresenta valores variáveis desde aproximadamente o nível do mar a Litoral, a 249m de altitude na Serra de Monte Figo (CMO, 2012).

De acordo com a Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (2008), o Algarve apresenta um clima tipicamente mediterrâneo, coincidindo a estação seca com o verão. A temperatura média anual é de 17,5°C, apresentando valores médios máximos de 28°C nos meses mais quentes (Julho e Agosto), e valores médios mínimos e máximos de 10°C e 18°C, respectivamente, no semestre mais frio (de Outubro a Março), conferindo um inverno ameno. No litoral, como é em parte a região de Olhão, nos meses mais frios (de Dezembro a Fevereiro) a temperatura atinge valores médios na ordem dos 12°C, os mais altos de todo o continente.

Oliveira (2010) afirma ainda que o Algarve possui um clima mediterrânico com muita insolação e de evapotranspiração, temperatura e humidade relativas medianas. No seu estudo, comparando dados de 1997 a 2010, determinou que a insolação varia entre cerca de 6 a 12 horas diárias de sol efectivo; a evapotranspiração potencial varia entre 1,5 mm e 7,3 mm; a temperatura média do ar varia anualmente entre 11°C e 25°C; e que a humidade relativa média do ar varia entre 54% e 81%, chegando contudo, a alcançar valores muito baixos na ordem dos 20%, nos meses de Julho e Agosto.

Quanto à precipitação, esta distribui-se entre os meses de Outubro a Abril, tendo maior incidência em Dezembro. O período de transição entre a época de chuvas e a época seca ocorre em Maio e Setembro, correspondendo os meses de Junho a Agosto à época seca.

Quanto à direcção do vento, verifica-se uma predominância da direcção do vento Nordeste no Algarve, sendo a sua velocidade (medida a 2 m de altura do solo) muito variável mesmo em regiões próximas, variando de acordo com a altitude e orografia presente (Oliveira, 2010).

O clima do concelho de Olhão não é homogéneo, uma vez que coexistem na mesma região mais no interior, campos e serras, e no litoral toda uma área lagunar, praias e sistemas dunares. Contudo, de um modo geral, também apresenta um clima temperado húmido mediterrâneo, com verões quentes e secos e invernos suaves. A precipitação distribui-se de forma irregular ao longo do ano, concentrando-se nos meses de Outono e Primavera, e à medida que se caminha para o interior do concelho, a influência marítima que se faz sentir na faixa litoral vai-se atenuando, tornando-se o clima mais quente e seco, e simultaneamente mais chuvoso (CMO, 2012).

2. População-alvo

A população em estudo, gatos pertencentes a freguesias do concelho de Olhão, foi retratada numa amostra constituída por “gatos domésticos” e “gatos errantes”, de acordo com a existência ou não de um proprietário.

Os gatos domésticos corresponderam a gatos apresentados a centros de atendimento médico-veterinário da região, por motivos de doença, razões cirúrgicas, ou para o “check-up” anual. Aos respectivos proprietários foi apresentada a possibilidade de vir a fazer parte do estudo, foi realizada uma breve explicação dos objectivos e mostrada a declaração de participação (Anexo IV). Aos que aceitaram foi realizado um inquérito (Anexo V) preenchido pelo clínico, de modo a obter informações relativas a cada animal (idade, sexo, raça), local de residência e deslocações, estilo de vida, contacto com outros animais, uso de fármacos profilácticos, entre outros; e onde o próprio clínico, após a realização da história pregressa e exame físico anotou os dados relevantes (sinais clínicos, ou lesões conciliáveis com as parasitoses em estudo, e doenças concomitantes). O inquérito embora tenha sido desenhado para o projecto “The role of domestic cats in the epidemiology of zoonotic leishmaniasis” foi igualmente adoptado para o presente trabalho por permitir também uma boa caracterização da amostragem no que respeita ao estudo da dirofilariose. Contudo, a autora teve o cuidado de alertar os clínicos para outros sinais que não os mencionados, e que deveriam ser também assinalados e remetidos juntamente com as amostras e inquéritos, nomeadamente, sinais respiratórios (tosse, taquipneia, dispneia) ou de foro cardíaco.

As amostras dos gatos errantes foram recolhidas aquando de campanhas de esterilização de modo a tentar controlar as populações de felinos vadios no concelho. Os inquéritos foram também preenchidos pelos clínicos responsáveis contudo, certas informações como a idade foram estimadas, e outras informações mantiveram-se, obviamente, desconhecidas.

A recolha de dados e de amostras biológicas (sangue periférico) decorreu no período compreendido entre Novembro de 2011 e Junho de 2012.

2.1. Critérios de inclusão

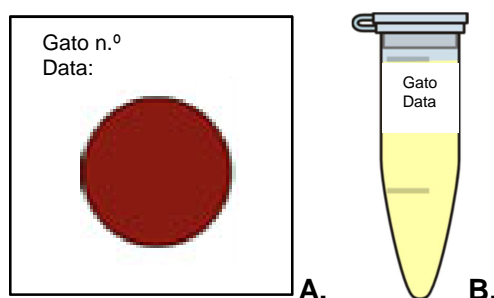
A amostra deste estudo inclui gatos com idade igual ou superior a 6 meses de idade.

3. Colheita e processamento do sangue periférico (Anexo VI)

As amostras de sangue periférico foram obtidas a partir da punção de veias periféricas (veia cefálica ou veia jugular), com os cuidados gerais de uma colheita de sangue. O volume de sangue recolhido encontrou-se, regra geral, entre os 2 a 3 ml, dos quais, um pequeno volume serviu para impregnar uma área equivalente a uma moeda de 2 euros (25 mm de diâmetro) em papel de filtro (Whatman® n.º3), e o restante foi colocado em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro. As alíquotas de soro e os papéis de filtro referentes a

cada amostra (Fig.14) foram devidamente identificados e guardados a -20°C e a +4°C, respectivamente, até posterior utilização.

Figura 14 – Ilustração das amostras.



A. Papel de filtro impregnado; **B.** Sororo.

(adaptadas de: **A** - <http://www.tellmepinkorblue.com>; **B** - <http://www.clker.com>)

4. Técnicas serológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e antígenos de *D. immitis*

4.1. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

O Teste de Aglutinação Directa (DAT) permite proceder à pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, e foi o teste escolhido para testar as amostras de sororo em estudo.

Atendendo às instruções do fabricante (KIT® Biomedical Research) prepararam-se os reagentes de modo a obter o antígeno liofilizado de *Leishmania* com uma densidade parasitária de 5×10^7 /ml, e uma solução de diluição com NaCl 0,9% e β-mercaptoetanol a 0,78%.

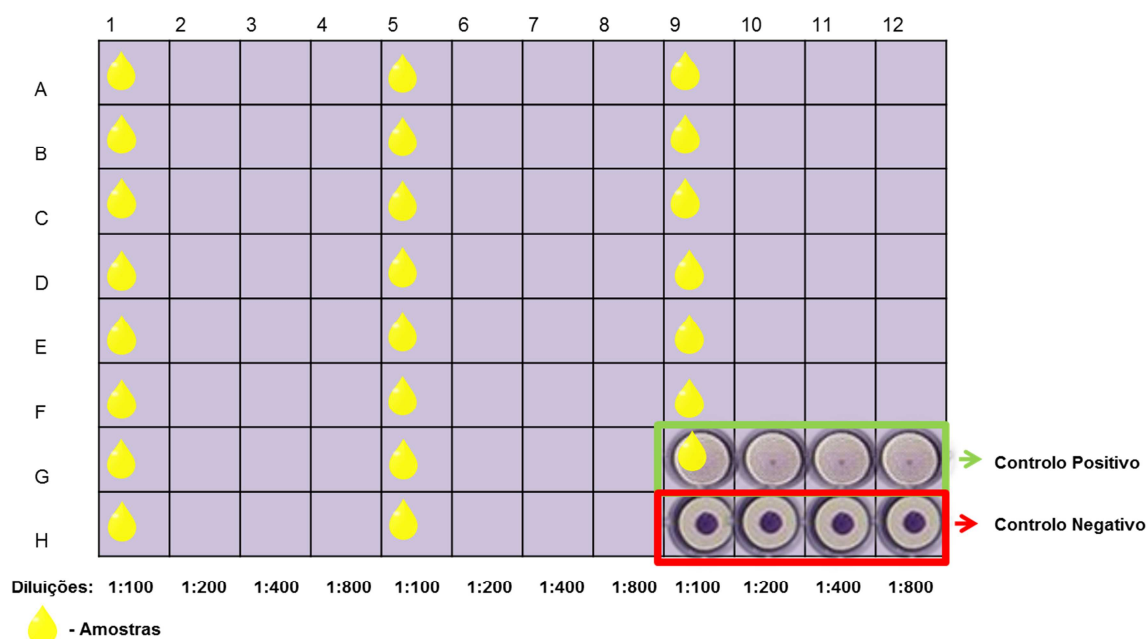
A execução do teste passou pela adição de 100 µl/poço da solução de diluição, na primeira coluna das microplacas de 96 poços com fundo cónico (DeltaLab, Espanha), e de 50 µl/poço nas colunas seguintes. Após adição de 1 µl do sororo a testar, no primeiro poço de cada linha (1:100), realizaram-se diluições seriadas de 1:2 nos poços restantes. Os poços de G9-G12 e H9-H12 foram utilizados como controlo positivo e negativo, respectivamente (Fig.15). Depois de efectuadas todas as diluições, foram adicionados 50 µl do antígeno reconstituído a cada poço.

Após 18 horas de incubação à temperatura ambiente, os resultados foram lidos a olho nú sobre um fundo branco (ver também Anexo VII: 1.1).

De acordo com Cardoso *et al.* (2010), consideraram-se positivos os sororos com reacção de aglutinação na diluição igual ou superior a 1:100.

Figura 15 – Ilustração do desenho seguido para cada placa de micro-titulação.

(adaptação de <http://www.kit.nl/kit/Leishmaniasis-diagnostics>).



4.2. Detecção de antígenos de *D. immitis*

O teste SNAP® Feline Triple® comercializado pela IDEXX® foi o teste escolhido para a pesquisa de antígenos circulantes de *D. immitis* nas amostras de soro, pela sua alta sensibilidade e especificidade, 86,7% e 100%, respectivamente. Adicionalmente, este teste permite também, o diagnóstico de FeLV e FIV, contribuindo para uma melhor caracterização da amostra em estudo.

Atendendo ao número de kits disponíveis, o teste foi realizado em 68 gatos (34 domésticos e 34 errantes) escolhidos aleatoriamente pela funcionalidade da fórmula “Aleatório” do programa Excel, segundo as indicações do fabricante (Fig. 16).

Resumidamente: após colocação do teste e do conjugado, à temperatura ambiente, 30 minutos antes da sua utilização, para cada amostra, colocaram-se 3 gotas de soro no respectivo tubo (cedido pelo fabricante), às quais se adicionaram 4 gotas do conjugado. Depois de se inverter o conteúdo 5 vezes, este foi vertido no poço da amostra e assim que alcançou o círculo de activação, o activador do teste foi pressionado. Os resultados foram lidos 10 minutos após a activação (ver também Anexo VII:2).

Figura 16 – Execução do teste SNAP® Feline Triple®.

(adaptado de IDEXX, 2012)

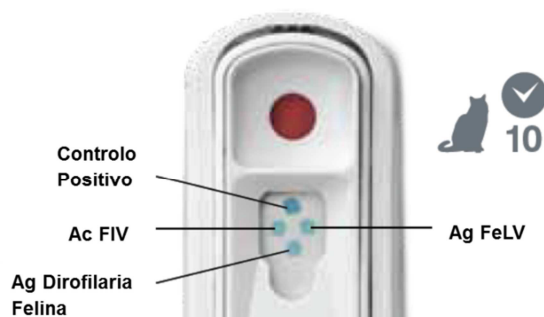


Segundo o fabricante, a interpretação dos resultados deve ser feita comparando a janela de resultados de cada amostra com a figura 17.

Um resultado positivo corresponderá a qualquer aparecimento de cor nos locais da presença de anticorpos (Ac) para FIV, e/ou antígenos (Ag) para FeLV e/ou (Ag) para *D. immitis*, na janela de resultados.

Figura 17 – Ilustração dos resultados positivos.

(adaptado de IDEXX, 2012)



Os resultados negativos correspondem a aqueles em que apenas se produz cor no local do controlo positivo.

O resultado é considerado inválido quando se produz uma cor de fundo que dificulta a interpretação dos resultados ou quando não aparece nenhuma cor no local do controlo positivo.

5. Detecção de ADN de *L. infantum* através da técnica de reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

A escolha desta técnica teve por objectivo a pesquisa de ADN cinetoplastideial de *L. infantum* a partir das amostras de sangue periférico impregnado em papel de filtro. Para isso, foi necessário executar várias etapas, nomeadamente, a extracção do ADN a partir de papel de filtro; o controlo da extracção; a amplificação do segmento de ADN do parasita, propriamente dita; a preparação do gel de agarose e electroforese dos produtos de PCR; e a visualização dos produtos de PCR após electroforese.

A extracção de ADN, a preparação da mistura de reacção, a amplificação por PCR, e a detecção da amplificação foram realizadas em áreas separadas, a fim de evitar contaminações.

A. Extração de ADN a partir de sangue impregnado em papel de filtro

Para a extração do ADN a partir de sangue impregnado em papel de filtro utilizou-se, após optimização do protocolo, um método rápido comercial (Kit Citogene®, Citomed), de acordo com as instruções do fabricante. Deste modo, utilizaram-se 2 discos do papel de filtro, de 4 mm de diâmetro cada, os quais foram a incubar em 150 µl de Cell Lysis e 1,5 µl de Proteinase K, durante 15 min a +65°C em placa térmica, seguida de uma incubação a +55°C durante 2 horas, em banho-maria, invertendo os eppendorfs de 30 em 30 min durante esse período. Terminada a incubação, retiraram-se os eppendorfs do banho-maria deixando arrefecer o lisado à temperatura ambiente. Após remoção dos discos, adicionaram-se em seguida 100 µl da solução precipitadora de proteínas, e para uma mistura uniforme usou-se o vortex a velocidade elevada durante 20 seg. A mistura foi então centrifugada a 84 g, durante 15 min, a +4°C, formando-se um “pellet” compacto de proteína. O sobrenadante (200 µl) foi transferido para uma nova alíquota contendo 300 µl de Isopropanol a 100%. A mistura depois de invertida 50 vezes foi centrifugada a 84 g, 5 min, a +4°C, e o sobrenadante dispensado. Adicionaram-se 300 µl de etanol a 70% e após a mistura ter sido suavemente invertida 20 vezes para garantir a lavagem do pellet de ADN, procedeu-se a uma nova centrifugação a 84 g, 1min, a +4°C. O sobrenadante foi rejeitado e as alíquotas foram colocadas abertas, em posição invertida, sobre papel absorvente, na estufa a +52°C até que todo o ADN estivesse completamente seco. Juntaram-se 30 µl de tampão de hidratação de ADN a cada uma das amostras, que foram mantidas à temperatura ambiente, durante a noite (Fig. 18). Na manhã seguinte, o ADN foi guardado a -20°C até posterior utilização (consultar Anexo VII:1.2.1 A).

Figura 18 – Ilustração dos principais procedimentos de extração de ADN utilizando o Kit Citogene®.



Legenda:

Da esquerda para a direita estão representadas: adição dos reagentes à alíquota com os discos; incubação; adição de reagentes após remoção dos discos; centrifugação; transferência do sobrenadante para nova alíquota; centrifugação e dispensa do sobrenadante (2x); secagem em estufa; hidratação do ADN; alíquota final. (fonte: Imagens originais e adaptadas de <http://www.clker.com>)

B. Controlo de Extracção de ADN – Amplificação de β -actina Felina

A decisão de incluir um controlo para avaliar a eficácia da técnica de extracção de ADN, foi fundamentada essencialmente, para descartar a presença de factores de inibição da PCR e/ou de degradação de ADN. Para tal, procurou-se amplificar um gene constitutivo, neste caso o gene codificador da β -actina, uma das proteínas que constituem o citoesqueleto. O desenho das sequências de iniciação (“primers”), efectuado pela Doutora Sofia Cortes, investigadora do grupo das leishmanioses, IHMT, foi baseado numa sequência parcial do gene da β -actina da espécie *Felis catus* (GenBank, número de acesso: GQ848333) usando o Programa Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA), obtendo assim o “primer” 5’ – Bet Fel1: 5’CCATTTTCTGTTCCGCCTTA3’, e o “primer” 3’ – Bet Fel2: 3’CAACGGGCTCCTTAGTCAGA5’, com uma identidade máxima de 100%.

Preparou-se para cada amostra (3 μ l de ADN), 22 μ l de uma mistura de reacção constituída por 12,3 μ l de água ultrapura, 5 μ l de tampão de reacção [tampão NH_4 (5X): 160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 μ l de uma solução de Mg^{2+} (25mM MgCl_2), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 1 μ l de primers Bet Fel1 e 1 μ l de Bet Fel2 (10 pmol/ μ l, cada), e 0,2 μ l da enzima polimerase de ADN Taq (5U/ μ l).

Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo 3 μ l de ADN genómico obtido de um baço de gato, e como controlo negativo, água ultrapura em substituição do ADN.

As condições da PCR foram aferidas ao longo do estudo tendo sido consideradas como condições óptimas: uma desnaturação inicial a 95°C, durante 5 min; seguida de uma amplificação de 35 ciclos com desnaturação (95°C; 30 seg), ligação dos primers (56°C; 30 seg), e extensão (72°C; 30 seg), e uma extensão final a 72°C, durante 5 min. Esta PCR foi realizada num termociclador (Thermo Electron Corporation® Px2 Thermal Cycler).

Os produtos de amplificação, constituídos por 229 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % em 1X tampão TAE (2,25g de agarose e 150 ml de tampão TAE 1X; corado com 0,2 μ g/ml de brometo de etídio após electroforese a 120 volts e 400 mA, durante 60 minutos. Foi aplicado no gel um marcador de massa molecular de 100 pb de ADN (consultar Anexo VII:1.2.1 B,C e E).

C. Amplificação de ADN cinetoplastideal (kDNA) de *Leishmania*

As sequências iniciadoras escolhidas para a pesquisa de ADN de *Leishmania*, MC1 e MC2, foram desenhados a partir de uma sequência de ADN cinetoplastideal de *L. infantum*, e originam um produto de amplificação de 447 pb (Cortes *et al.*, 2004). Estes “primers” foram escolhidos atendendo à sua alta especificidade e sensibilidade.

Preparou-se, para cada amostra (5 μ l de ADN), 20 μ l de uma mistura de reacção constituída por 5,3 μ l de água ultrapura, 5 μ l de tampão de reacção [tampão NH_4 (5X): 160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 μ l de uma solução de Mg^{2+} (25mM MgCl_2), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 3 μ l de primers MC1 e 3 μ l de MC2 (5 pmol/ μ l, cada), e 0,2 μ l da

enzima polimerase de ADN Taq (5U/μl). Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo 1 μl de ADN genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultrapura em substituição do ADN.

As condições óptimas para as amplificações por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C, durante 2 min; seguida de uma amplificação de 30 ciclos com desnaturação (94°C; 20 seg), ligação dos primers (60°C; 20 seg), e extensão (72°C; 30 seg). Depois do último ciclo a extensão final decorreu a 72°C, durante 5 min (consultar Anexo VII: 1.2.1 C).

Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % como descrito anteriormente.

5.1. PCR-RFLP - Restrição enzimática dos produtos de PCR

No sentido de se avaliar as amostras em termos de variabilidade genética, efectuou-se a restrição enzimática dos produtos de PCR das amostras positivas com os marcadores moleculares MC, utilizando as endonucleases de restrição *BglII*, *Bme1390I*, *DdeI*, *HpaII*, *RsaI* e *VspI*. A restrição e a análise dos resultados, em termos de padrões e genótipos obtidos foram efectuadas de acordo com o descrito em Cortes *et al.* (2006) e seguindo o protocolo em anexo, Anexo VII:1.2.2.

6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 20.0 para o Windows. O teste não paramétrico Qui-quadrado foi o teste escolhido para relacionar os resultados serológicos e moleculares com as variáveis em estudo (origem, idade, sexo, raça, pelagem, estilo de vida, convivência com outros animais, deslocações, uso de insecticidas, desparasitações, vacinação, sinais clínicos, infecção por FIV/FeLV). Todavia, quando não estavam reunidas as condições para a realização do mesmo, o Teste Exacto de Fisher foi escolhido como segunda opção, usando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

1. Caracterização da amostra

A amostra em estudo correspondeu a um total de 217 gatos provenientes do concelho de Olhão, cuja distribuição pelas 5 freguesias se encontra ilustrada no gráfico 4. Da sua análise, depreende-se que a maioria dos gatos era proveniente da Freguesia de Olhão (29%) (63/217), seguindo-se a freguesia de Moncarapacho (11%) (24/217), Quelfes (7%) (15/217), Fuzeta (4%) (8/217) e Pechão (2%) (5/217), contudo em 47% (102/217) dos animais essa informação não se encontrava disponível.

Quanto à sua origem, apenas 19% dos gatos apresentaram proprietário (42/217), correspondendo 81% da amostra a gatos errantes (175/217) (Gráfico 5).

Gráfico 4 – Distribuição dos gatos pela freguesia de proveniência (frequência relativa, n=217).

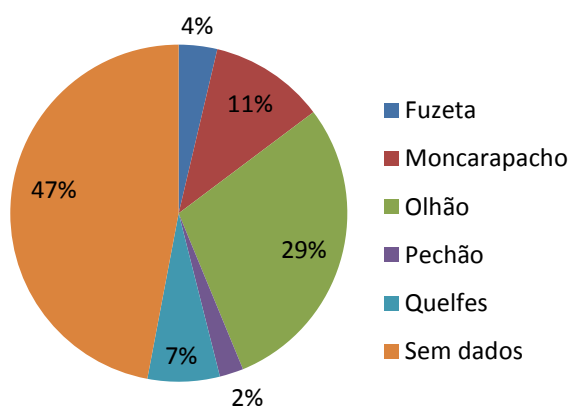
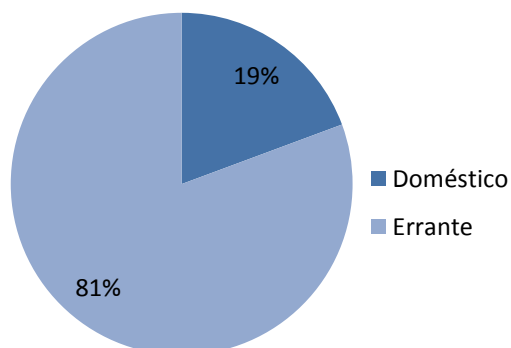


Gráfico 5 – Distribuição da amostra segundo a sua origem (frequência relativa, n=217).



Relativamente ao sexo, 33% (72/217) dos gatos eram do sexo masculino e 67% (145/217) do sexo feminino, 94% (204/217) inteiros e 6% (12/217) castrados.

No que diz respeito à idade, os dados foram agrupadas em intervalos, correspondendo à categoria “Jovem” os animais com idade compreendida entre os 6 meses e 11 meses de idade, a “Adulto” os animais de 1 ano até aos 7 anos, e a “Sénior” os animais com mais de 7 anos, seguindo o exemplo de Cardoso *et al.* (2010). O valor mínimo observado foi de 6 meses (atendendo ao critério de exclusão do estudo) e o máximo de 16 anos. Em 76% (165/217) dos gatos a idade era desconhecida, mas os restantes foram agrupados em categorias (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Distribuição dos gatos pela classificação etária (frequência relativa, n=217).

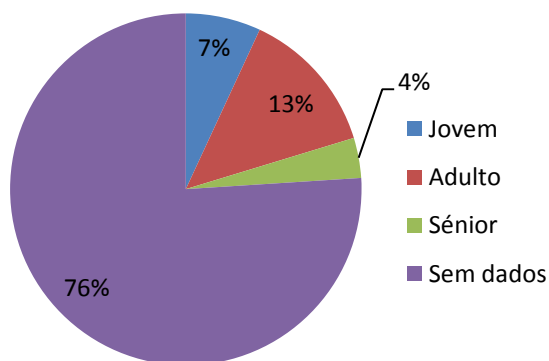
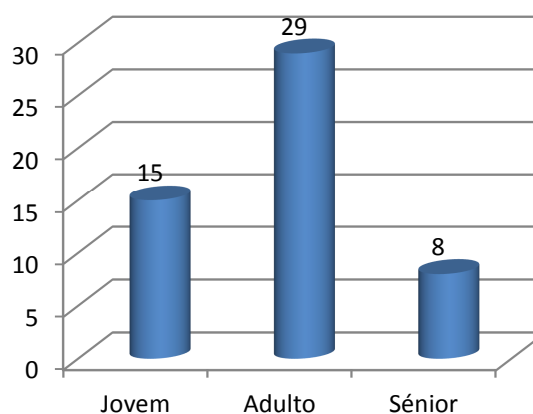


Gráfico 7 – Escala etária dos gatos de Olhão (frequência absoluta, n=52).



Os gráficos 6 e 7 mostram que a maioria dos gatos foi distribuída pela categoria “Adulto” (n=29, 13%), seguindo-se a categoria “Jovem” (n=15, 7%) e pela categoria “Sénior” (n=8, 4%).

O tipo de raça não estava indicado em 151 gatos, mas dos dados obtidos a raça mais prevalente foi a “Europeu Comum” em 37 gatos (17%), seguida da “Siamês ” e “cruzado de Siamês” com 2 gatos cada (0,9%), e da raça “Persa” e “cruzado de Maine Coon” com 1 gato cada (0,5%). Em 23 casos a raça foi anotada como indefinida (10,6%).

A pelagem curta foi observada em 60,8% dos gatos (n=132), a pelagem média em 0,5% (n=1) e a comprida em 1,4% (n=3); 81 gatos (37,3%) não tinham qualquer indicação sobre o tipo de pelagem (Gráficos 8 e 9).

Gráfico 8 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de raça (frequência relativa, n=217).

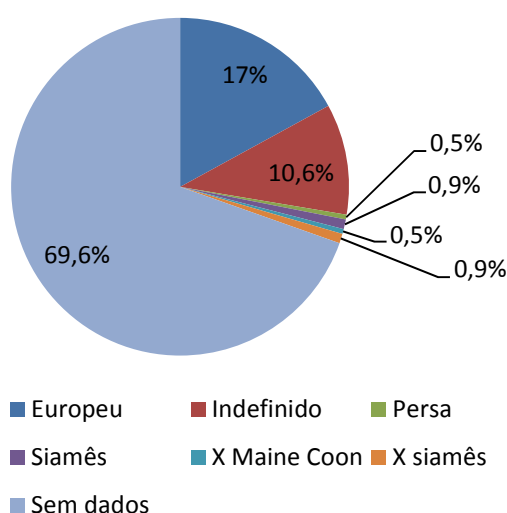
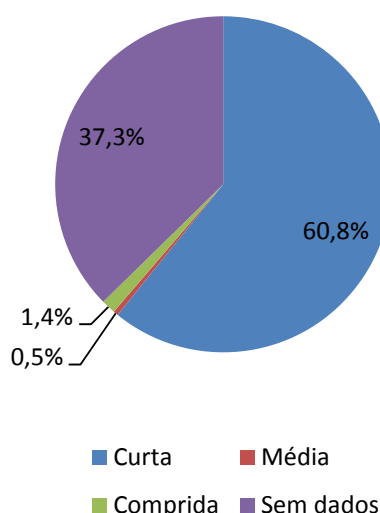


Gráfico 9 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de pelagem (frequência relativa, n=217).



Quarenta e seis (84%) dos 55 gatos em que foi possível obter informação tinham contacto com outros animais (4 com cães, 20 com gatos, 1 com outra espécie, 10 com cães e outras espécies, e em 11 gatos, o animal de estimação não estava assinalado), enquanto 9 (16%) não conviviam com nenhum outro animal de estimação.

Em termos de movimentações dos animais em território nacional e internacional, 186 (86%) gatos não faziam deslocações, dos três (1,4%) que se deslocavam, um fazia viagens por território algarvio, outro viajou para o Reino Unido, e no terceiro o local de deslocação não estava descrito. Em 28 animais não havia informação disponível.

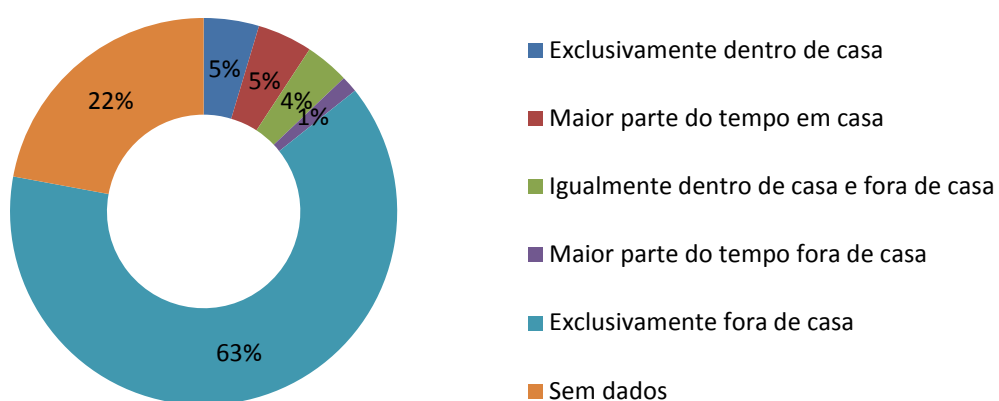
No que respeita a desparasitações externas, 32 gatos não apresentavam informação disponível, em 176 gatos a prevenção contra ectoparasitas não era realizada regularmente (81%), e apenas 9 tinham informação positiva (4%). Em 28 gatos não foi possível obter os

dados relativos às desparasitações internas, enquanto 174 (80%) não recebiam qualquer medida profiláctica contra endoparasitas, e só 15 gatos (7%) se encontravam desparasitados internamente.

Com a excepção de 30 animais em que não foi possível obter informação acerca do seu estado vacinal, verificou-se que 18 gatos encontravam-se vacinados (8,3%) e 169 não (78%).

Relativamente ao estilo de vida, a maioria dos gatos que constituem a amostra permaneciam “Exclusivamente fora de casa” (63%, 138/217), 5% mantinham-se “Exclusivamente dentro de casa” e “Maior parte do tempo em casa” (10/217, em cada), enquanto 4% passavam igual tempo dentro e fora de casa (8/217), e apenas 1% permaneciam a “Maior parte do tempo fora de casa” (3/217); em 22% (48/217) dos casos essa informação era desconhecida (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (frequência relativa, n=217).



Dos 217 gatos, e atendendo aos dados conhecidos, apenas 1 gato apresentava sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, e apenas 8 animais tinham outras doenças concomitantes diagnosticadas.

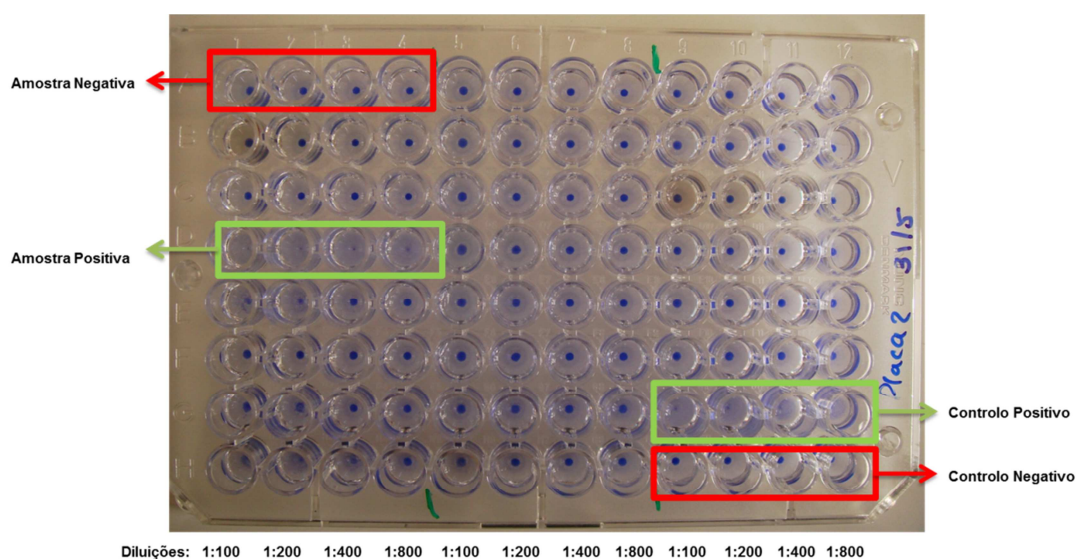
2. Rastreio de infecção por *Leishmania* spp.

Através da técnica de aglutinação directa detectaram-se anticorpos específicos anti-*Leishmania* em 9 (4,2%) dos 215 animais testados (em 2 casos não existiam as amostras de soro), e o título de anticorpos variou entre 100 e 800 (100, n=6; 200, n=2; 800, n=1).

A imagem 19 ilustra os resultados de uma placa de DAT.

Figura 19 – Ilustração dos resultados obtidos pela técnica serológica DAT.

(Original).

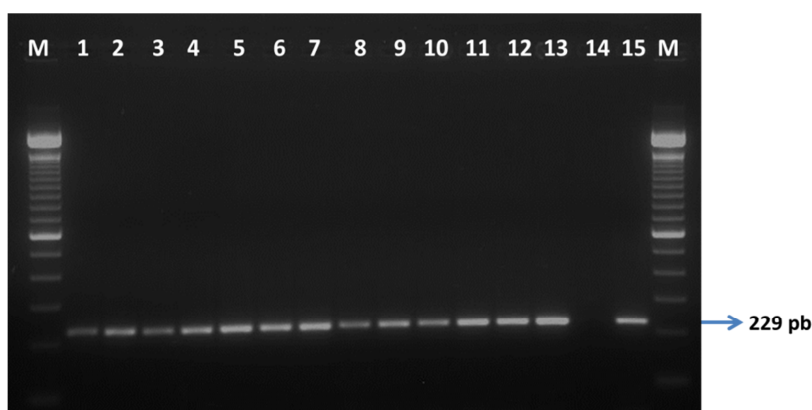


O ADN do parasita foi amplificado no sangue periférico de 1 gato (0,5%) dos 217 felinos da amostra; este animal foi negativo pela técnica serológica.

As imagens 20 e 21 ilustram, respectivamente, a electroforese em gel de agarose dos controlos de extracção (amplificação da β -actina felina) e dos produtos de amplificação por PCR para pesquisa de *L. infantum*.

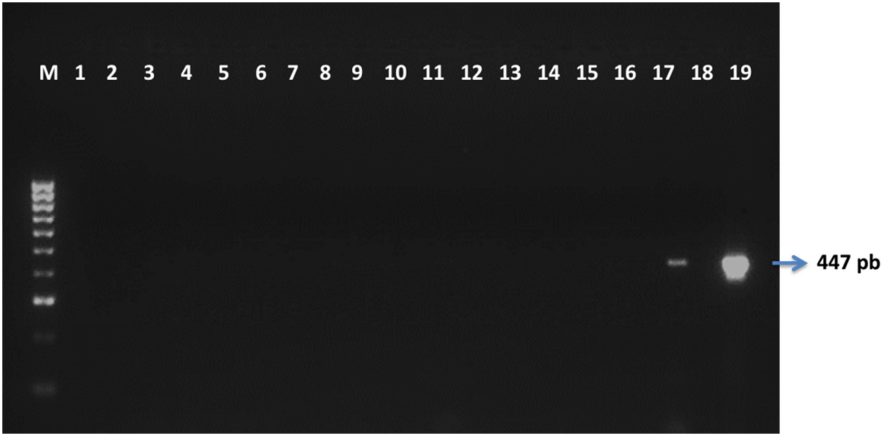
Figura 20 – Fotografia dos resultados da PCR para amplificação da β -actina felina.

(Original).



Legenda: M – marcador de 100pb; colunas 1-13 – amostras em estudo; coluna 14 – controlo negativo; coluna 15 – controlo positivo.

Figura 21 – Fotografia dos resultados da PCR para pesquisa de *L. infantum*.
(Original).



Legenda: M – marcador de 100pb; colunas 1-17 – amostras em estudo; coluna 17 – amostra positiva; coluna 18 – controlo negativo; coluna 19 – controlo positivo.

Após a restrição do produto de amplificação da amostra positiva por PCR com os marcadores MC, verificou-se que todas as enzimas originaram fragmentos de restrição. Os fragmentos de restrição obtidos estão de acordo com o descrito em Cortes *et al.* (2006), correspondendo aos seguintes padrões para as respectivas enzimas: *Bgl*II, padrão II (258 pb, 189 pb); *Bme*1390I padrão I (411 pb, 36 pb); *Dde*I, padrão II (419 pb, 28 pb); *Hpa*II, padrão I (410 pb, 37 pb); *Rsa*I, padrão I (253 pb, 194 pb); *Vsp*I, padrão I (160 pb, 150 pb e 137 pb) (Quadro 1). A combinação dos diversos padrões originou o genótipo A (Quadro 2).

Quadro 1 – Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease.

(Adaptado de Cortes *et al.*, 2006).

Endonucleases	<i>Bgl</i> II		<i>Bme</i> 1390 I			<i>Dde</i> I			<i>Hpa</i> II				<i>Rsa</i> I			<i>Vsp</i> I			<i>Pst</i> I	<i>Sfc</i> I	<i>Xap</i> I
Padrões	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	I	II	III	I	I	I
	447	258	411	288	447	319	419	240	410	287	447	350	253	210	253	160	170	310	298	224	347
Fragmentos de restrição (pb)		189	36	123		100	28	179	37	123		60	194	197	146	150	137	137	149	153	60
				36		28	28		37	37			40	48		137	90		70	40	
																	50				

Legenda: pb – pares de base; - resultados obtidos pela restrição enzimática.

Quadro 2 – Genótipos obtidos pelas endonucleases.

(Adaptado de Cortes *et al.*, 2006).

Profiles	Patterns with restriction enzymes					
	<i>Bgl</i> III	<i>Bme</i> 1390I	<i>Dde</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Vsp</i> I
A	II	I	II	I	I	I
B	I	I	I	I	I	I
C	II	I	III	I	I	I
D	I	II	I	II	I	I
E	I	I	II	I	I	I
F	I	I	I	IV	I	I
G	I	I	I	I	II	II
H	II	I	I	I	II	II
I	II	I	I	I	I	II
J	I	I	I	I	IV	I
K	I	III	I	III	I	I
L	I	II	I	II	IV	I
M	I	III	I	IV	II	I
N	I	I	I	III	I	I
O	I	I	I	I	I	II

Dos dez animais positivos para a pesquisa de *Leishmania* spp. (Tabela 4), seis errantes e quatro domésticos, três pertenciam ao sexo masculino e sete eram fêmeas, duas das quais encontravam-se esterilizadas.

Apesar de não ter sido possível obter todos os dados referentes a estes animais, dois animais tinham oito anos e dois um ano, quatro gatos pertenciam à raça Europeu Comum e seis apresentavam pelagem curta. Quanto ao estilo de vida, seis viviam exclusivamente fora de casa, dois passavam a maior parte do tempo em casa e um estava em igual período dentro e fora de casa. Apenas dois dos animais eram vacinados e desparasitados internamente, e a um deles era ainda administrada profilaxia contra ectoparasitas.

Embora não esteja representado na tabela, estes animais não efectuavam deslocções, não se encontravam infectados com o FIV e apenas um dos animais (gato 92) se apresentava co-infectado com o FeLV. Em nenhum dos animais positivos para a leishmaniose foi possível obter informação sobre a existência ou não de sinais clínicos.

A análise estatística realizada não encontrou associações estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre a variável leishmania e as demais variáveis analisadas (origem, idade, sexo, raça, pelagem, estilo de vida, convivência com outros animais, deslocções, uso de insecticidas, desparasitações, vacinação, sinais clínicos, infecção por FIV/FeLV).

Tabela 4 – Descrição dos casos positivos para a pesquisa de infecção por *Leishmania* spp..

Gato	PCR	DAT (título)	Origem	Idade (m)	Sexo	Raça	Pelagem	Estilo de vida	Convive com outros animais	Insecticidas	Desparasitação	Vacinação	Doenças Concomitantes
58	Positivo	Negativo	Errante	-	M	Indefinido	Curta	Exclusivamente no exterior	-	Não	Não	Não	-
92	Negativo	800	Errante	-	M	-	-	-	-	Não	Não	Não	-
102	Negativo	200	Errante	-	F	-	-	Exclusivamente no exterior	-	Não	Não	Não	-
109	Negativo	200	Errante	-	F	-	-	Exclusivamente no exterior	-	Não	Não	Não	-
116	Negativo	100	Errante	-	F	-	Curta	Exclusivamente no exterior	-	Não	Não	Não	-
119	Negativo	100	Errante	-	F	-	-	Exclusivamente no exterior	-	Não	Não	Não	-
212	Negativo	100	Doméstico	96	F C	Europeu	Curta	A maior parte dentro de casa	Cães	Advantage	Milbemax	Sim	Não
227	Negativo	100	Doméstico	16	F	Europeu	Curta	Exclusivamente no exterior	Gatos	Não	Não	Não	Não
255	Negativo	100	Doméstico	12	M	Europeu	Curta	A maior parte dentro de casa	Gatos	Não	Não	-	-
256	Negativo	100	Doméstico	98	F C	Europeu	Curta	Igualmente dentro e fora de casa	Gatos	-	Milbemax	Sim	-

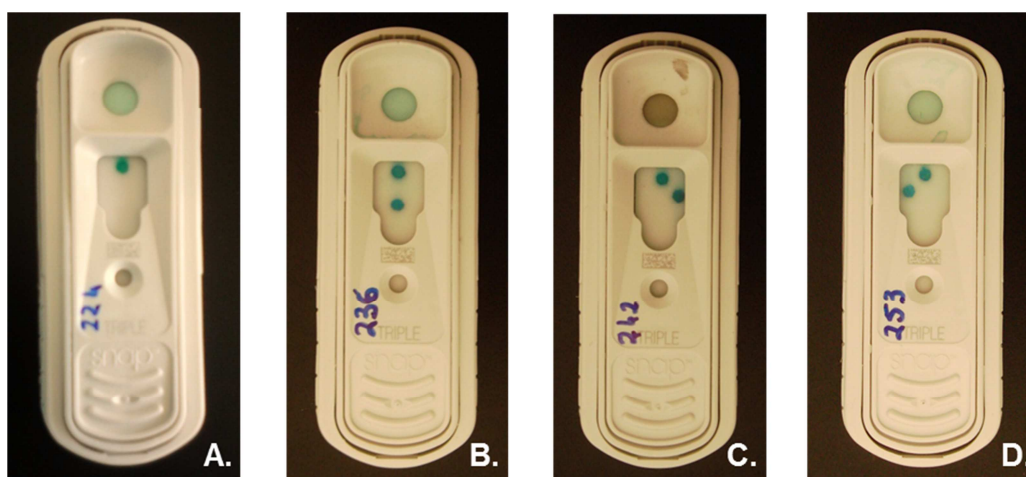
Legenda: “-” – ausência de informação; M – masculino; F – feminino; FC – fêmea castrada.

3. Rastreo de infecção por *Dirofilaria immitis*

A prevalência obtida para a pesquisa de infecção por *Dirofilaria immitis* foi de 5,9% (4/68). As prevalências obtidas para FIV e FeLV foram de 4,4% para FIV (3/68) e 10,3% para FeLV (7/68) respectivamente.

Figura 22 – Aspecto do teste SNAP® Feline Triple® depois de executado.

(Original).



A – resultados negativos para a análise dos agentes das 3 doenças pesquisadas pelo kit; **B** – resultado positivo para dirofilariose; **C** – resultado positivo para FeLV; **D** – resultado positivo para FIV.

A tabela 5 caracteriza os gatos que apresentaram resultados positivos para pesquisa de infecção por *Dirofilaria immitis*. Deste modo, observa-se que três dos quatro gatos positivos eram animais errantes, três fêmeas e um macho, e que três deles viviam exclusivamente fora de casa. Nenhum dos animais seropositivos efectuava deslocações, nem se encontravam desparasitados interna e externamente, ou vacinados. Nenhum gato estava infectado pelo vírus FIV, mas dois encontravam-se co-infectados com o vírus FeLV.

A análise estatística realizada não encontrou relação entre a variável dirofilaria e as variáveis origem, idade, sexo, raça, pelagem, estilo de vida, convivência com outros animais, deslocações, uso de insecticidas, desparasitações, vacinação, sinais clínicos, infecção por FIV, contudo, verificou-se uma correlação com a variável FeLV ($p=0,049$).

Tabela 5 – Descrição dos casos seropositivos para a infecção por *Dirofilaria immitis*.

Gato	<i>Dirofilaria immitis</i>	Origem	Idade (m)	Sexo	Raça	Pelagem	Estilo de vida	Convive com outros animais	Deslocações	Insecticidas	Desparasitação	Vacinação	Sinais Clínicos	Doenças Concomitantes	FIV	FeLV
92	Positivo	Errante	-	M	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	Não	Sim
147	Positivo	Errante	-	F	-	-	Exclusivamente fora de casa	-	Não	Não	Não	Não	-	-	Não	Não
162	Positivo	Errante	-	F	-	-	Exclusivamente fora de casa	-	Não	Não	Não	Não	-	-	Não	Sim
236	Positivo	Doméstico	24	F	Euro-peu	Curta	Exclusivamente fora de casa	Gatos	Não	Não	Não	Não	-	-	Não	Não

Legenda: “-” – ausência de informação; M – masculino; F – feminino.

Nota: Após análise dos resultados finais é possível verificar ainda a ocorrência da co-infecção por *Leishmania* spp. – *Dirofilaria immitis* – FeLV no caso do gato número 92, uma vez que esta animal apresentou anticorpos anti-*Leishmania* pelo teste DAT e foi positivo para *Dirofilaria immitis* e FeLV pelo teste SNAP.

Discussão

O estudo agora apresentado veio documentar pela primeira vez, tanto quanto sabemos, a existência da infecção (e co-infecção) por *L. infantum* e *D. immitis* na população felina residente no Sul de Portugal. A existência de casos positivos veio reforçar a ideia de que a LFel e a DFel devem passar a ser incluídas sistematicamente, na prática clínica, como diagnósticos diferenciais, especialmente, em áreas onde estas parasitoses são endémicas.

Como o papel epidemiológico do gato tanto na leishmaniose como na dirofilariose não está totalmente clarificado, a realização de rastreios é fundamental principalmente em zonas endémicas (Kramer & Genchi, 2002; Mancianti, 2004; Solano-Galego, 2007; Maia, 2008).

O Algarve é considerado uma região endémica de leishmaniose e dirofilariose caninas (Maia & Campino, 2010; Araújo 1996, citado por Morchón *et al.*, 2012). A região de Olhão, área geográfica do estudo, apresenta zonas de relevo mais acidentado cobertas de matagal mediterrâneo convergindo a sul com extensas áreas de sequeiro, mas a sua faixa litoral é caracterizada por um sistema lagunar e dunar, propiciando microhabitats terrestres e aquáticos para o desenvolvimento das fases imaturas dos flebótomos e dos mosquitos culicídeos, respectivamente (CMO, 2012). De modo a determinar a prevalência da infecção de leishmaniose e dirofilariose felinas na região de Olhão foi estudada uma amostra de duzentos e dezassete gatos (domésticos e errantes) com mais de seis meses de idade através da técnica serológica de aglutinação directa (DAT) e da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) no caso da leishmaniose, e do teste SNAP para pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis*.

De um modo geral os objectivos propostos foram alcançados. O objectivo principal, a determinação da prevalência destas parasitoses foi completamente atingindo pelo estudo de uma amostra relativamente grande (217 animais foram testados para a infecção por *L. infantum*, e 68 desses para *D. immitis*) da população felina da região de Olhão. As prevalências obtidas foram até superiores ao espectável, principalmente para a dirofilariose. O objectivo da divulgação destas parasitoses e a sensibilização de proprietários e clínicos para o tema também foi alcançado, pela abordagem feita aos proprietários e representantes de associações que aceitaram participar no estudo, e pelas parcerias com vários centros de apoio médico-veterinário. Mais ainda, essa divulgação está projectada no futuro, através da publicação dos resultados obtidos pelo presente trabalho, pela continuidade dos projectos, e através da apresentação de resultados em congressos e seminários, sendo intenção da autora levar já estes dados ao “XVI Congresso Português de Parasitologia” a decorrer no presente ano. Relativamente ao terceiro objectivo proposto eram esperadas algumas dificuldades no seu cumprimento. É sabido que a realização de inquéritos por colaboradores externos aos projectos resulta muitas vezes na obtenção de dados de uma forma incompleta. Adicionalmente, o facto de os animais em estudo serem principalmente errantes, e portanto sem proprietário, limitou à partida o conhecimento de alguns dos dados

que se pretendiam obter. Não foi assim viável conduzir uma boa análise dos possíveis factores de risco inerentes a estas parasitoses. Idealmente, no futuro poderá ser possível obter taxas mais elevadas de sucesso com o uso de questionários se, por exemplo, eles forem realizados pelos autores do estudo, ou por terceiros mas com um acompanhamento e/ou incentivo. As limitações relativas ao estilo de vida errante dos animais são basilares e têm que ser aceites como tal e previstas aquando do desenho do estudo.

1. Rastreio de infecção por *Leishmania* spp.

O diagnóstico laboratorial parasitológico e/ou serológico precoce das infecções por *Leishmania* spp. é de elevada importância, uma vez que permite evitar o desenvolvimento de sinais clínicos ou mesmo a morte do paciente e serve também como medida de controlo (Maia, 2008).

Embora os tecidos comumente utilizados para a pesquisa de *Leishmania* spp. sejam aspirados de medula óssea, de gânglio linfático e pele, estas amostras biológicas são obtidas por técnicas invasivas, incompatíveis com a realização de estudos epidemiológicos onde um elevado número de amostras têm de ser processado (Maia, 2006; Alvar *et al.*, 2004, citado por Maia & Campino, 2008). Além disso, a LFeI não é de conhecimento da maioria do público pelo que, seria difícil a obtenção de amostras mais invasivas, principalmente se os animais não apresentassem qualquer sinal clínico compatível com a doença. Por estes motivos a colheita de sangue periférico, menos invasiva que as anteriormente descritas, permitiu simultaneamente a obtenção de soro e a impregnação de papel de filtro para pesquisa do material genético do parasita. Por outro lado, as amostras em papéis de filtro são de fácil conservação, a +4°C, mantendo resultados idênticos mesmo 36 meses depois de armazenados (Campino *et al.*, 2000 citados por Maia, 2006).

Actualmente, as organizações de saúde pública recomendam a realização de pelo menos dois testes para o diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp., com base em metodologias diferentes, uma vez que não existe um teste 100% sensível e específico (McCown & Grzeszak, 2010). Deste modo, no presente trabalho optou-se pela realização de uma técnica serológica e de uma técnica molecular. À semelhança do trabalho desenvolvido por Cardoso *et al.* (2010) optou-se pela realização da DAT, e pela realização da PCR segundo Cortes *et al.* (2004). A técnica serológica escolhida é frequentemente usada para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em seres humanos e cães (Schallig *et al.*, 2002, citado por Cardoso *et al.*, 2010), mas poucas vezes em gatos, cujos títulos observados são muito menores, relativamente aos observados em cães, obrigando à realização de diluições menores (Cardoso *et al.*, 2010).

A prevalência global da infecção por *Leishmania* spp. obtida neste estudo foi de 4,6%, considerando como positivos, todos os animais com DAT ou PCR positivas. Foram detectados anticorpos específicos anti-*Leishmania* em 9 (4,2%) dos 215 gatos testados e

ADN do parasita no sangue periférico de 1 gato (0,5%) dos 217 felinos da amostra, sendo contudo, este animal negativo pela técnica serológica.

As diferenças observadas nas prevalências por serologia e pela técnica molecular têm sido reportadas por vários autores (Martín-Sánchez *et al.*, 2006, Cardoso *et al.*, 2010, Maia & Campino, 2011). De facto, a detecção de anticorpos não implica necessariamente que esteja presente uma infecção activa, sendo apenas sinal da exposição à infecção (Martín-Sánchez *et al.*, 2006). Neste trabalho, as amostras de sangue de apenas dois dos nove gatos seropositivos foram colhidas em Junho, durante a época de actividade flebotómica (ou seja, de potencial transmissão do parasita). Como em ambos os animais não se detectou o ADN de *L. infantum*, a presença de anticorpos poderia ser devida a uma infecção antiga em que já tenha ocorrido eliminação do parasita (Ikonomopoulos, 2003, citado por Maia, 2006). Por outro lado, a parasitémia existente na circulação sanguínea é tardia, intermitente e a carga parasitária é muito inferior à existente nos órgãos internos podendo ser responsável por resultados falsos negativos (Manna *et al.*, 2004, citados por Maia, 2006; Vita *et al.*, 2005).

No caso do gato positivo por PCR mas com serologia negativa, pode considerar-se a hipótese de se tratar de uma infecção na sua fase inicial, em que ainda não tenham sido produzidos anticorpos específicos, ou que estes não tenham sido produzidos em quantidade suficiente para serem detectados pela técnica serológica escolhida. A falta de produção ou o baixo nível de anticorpos poderá estar ainda relacionada com o facto da forma clínica mais comum de LFel ser a forma cutânea e não a visceral, evitando a disseminação sistémica dos parasitas e a consequente produção de anticorpos. Desconhece-se a existência de outras doenças concomitantes neste animal, mas a depressão do sistema imunitário e consequente incapacidade de produção de anticorpos específicos poderá também justificar o resultado seronegativo (Solano-Gallego *et al.*, 2007). Importa referir que esta amostra foi recolhida em Novembro pelo que o resultado positivo indica uma infecção “verdadeira” e não uma infecção transitória como poderia ser o caso, se tal amostra fosse recolhida durante o período de transmissão do parasita (Maia & Campino, 2011).

A seroprevalência obtida neste estudo através da técnica DAT é superior à prevalência determinada por Cardoso *et al.* (2010) para a região Norte, de 1,9% (6/316), mas aproximasse aos 6,3% (6/95) obtidos por Carreira (2012) na RML. Tendo em conta que a prevalência da infecção oscila ao longo dos anos e está relacionada com o número de flebótomos infectados existentes e com a sua actividade (directamente condicionada pelas condições climáticas), a discrepância entre as seroprevalências observadas entre os estudos realizados durante 2012 e o de Cardoso *et al.* (2010) realizado com amostras recolhidas entre 2004 e 2008 poderá ser devida a um menor número de vectores nos anos anteriores ao estudo.

Por outro lado quando comparada às recentes prevalências determinadas para a população canina residente na região algarvia, encontra-se mais próxima do valor detectado em animais aparentemente saudáveis (3,8%), já que a prevalência determinada para animais com sinais clínicos foi de 25,7% (Cardoso *et al.*, 2012). Não se sabe contudo se estes felinos apresentavam algum sinal compatível com esta parasitose, pois a informação não estava disponível.

Importa salientar que a maioria dos gatos positivos por DAT se encontrava muito perto do limiar de positividade (1:100), estabelecido de acordo com o mencionado no estudo de Cardoso *et al.* (2010) com o objectivo de haver também um grau de uniformização entre estudos. Nesta fase do estudo não foram realizadas diluições menores mas estas poderão ser realizadas de futuro caso se considere relevante, por exemplo por se optar por um valor de “cut-off” (limiar de positividade) menor. Adicionalmente, em estudos futuros a sensibilidade da técnica poderia ser avaliada testando a ocorrência de reacções cruzadas com outros anticorpos dirigidos a outros parasitas. Outro dado a ter em conta é que o nível de anticorpos diminui ao longo do tempo, e provavelmente, estes gatos conseguiram debelar a infecção, e se fossem testados mais tarde poderiam resultar em dados negativos, assim a presença de anticorpos está também relacionada com uma “janela temporal” de detecção, experimentalmente foi possível detectar anticorpos até 72 semanas após a infecção, mas não se sabe precisamente por quanto tempo estes persistem (Simões-Mattos *et al.*, 2005).

Apesar de não terem sido encontrados, estatisticamente, factores de risco associados à infecção por *Leishmania* spp., seis dos dez animais positivos eram errantes e todos os animais tinham mais de um ano de idade o que pode estar relacionado com a maior probabilidade de exposição ao vector. Embora a maioria dos autores não encontre a prevalência da infecção relacionada com o sexo (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Diakou *et al.*, 2009) no nosso estudo sete dos dez gatos eram do sexo feminino, corroborando os resultados obtidos por Pennisi (2002). Contudo, observando a amostra obtida, estes dois últimos dados podem estar relacionados com o facto de a amostra ser constituída predominantemente por gatos errantes, 81%, e por fêmeas, 67%. É importante referir que as amostras de gatos errantes foram recolhidas em campanhas de esterilização, onde poderá ter ocorrido uma preferência pelas fêmeas no sentido de gerir populações de gatos vadios, e assim a amostra poderá estar enviesada relativamente à população felina de Olhão. Para uma melhor averiguação da influência do sexo nesta parasitose, serão necessários conhecimentos relativamente à distribuição dos géneros na população do local amostrado e a amostra de população estudada deverá ser representativa da população de onde provém. A raça Europeu Comum e a pelagem curta surgiram na maioria dos casos, possivelmente porque esta raça foi a mais prevalente na amostra, e porque os flebótomos preferem alimentar-se em zonas com menor densidade pilosa (Killick-Kendrick, 1999). O efeito

protector da permanência exclusivamente dentro de casa não pôde ser avaliado, mas da informação disponível, nove dos animais positivos tiveram acesso ao exterior facilitando o contacto com o vector. Factores imunossupressores tais como o FIV e FeLV foram associados ao aparecimento de doença (Grevot *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007), contudo, neste estudo apenas se observou um caso de co-infecção FeLV-*Leishmania* spp..

A diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal, tem sido estudada com base em diferentes marcadores moleculares (Cortes *et al.*, 2006). Neste estudo foi efectuada a metodologia de kDNA-PCR-RFLP segundo Cortes *et al.* (2006). A análise combinada dos padrões de restrição das seis endonucleases neste trabalho revelou que este caso de infecção felina foi causado pelo genótipo mais frequente nos casos humanos e caninos assim como em estirpes isoladas de flebótomos em Portugal, o genótipo A. Apesar de ter sido genotipada apenas uma amostra felina, este resultado veio mostrar que o gato parece fazer parte do ciclo do parasita. No entanto é necessário genotipar um maior número de parasitas isolados de amostras felinas de modo a poder fazer uma comparação mais fidedigna com os genótipos encontrados em outros hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Porém, de um modo geral estes resultados verificam os conceitos de Bray (1982, citado por Maia, 2008): (i) um reservatório tem de estar em estreito contacto com o homem através do vector, (ii) deverá apresentar o parasita ao vector em quantidade suficiente e no estado adequado para que lhe cause infecção, o que já foi demonstrado através do xenodiagnóstico em gatos infectados (Maroli *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010); e (iii) que a infecção provocada seja de carácter crónico, isto é, que o animal suporte a presença do parasita por um longo período pelo menos até uma próxima época de transmissão.

2. Rastreio de infecção por *Dirofilaria immitis*

Os estudos serológicos que visam avaliar o risco de exposição dos felinos à infecção por *D. immitis*, podem auxiliar na decisão de se implementar ou não, medidas profiláticas na população felina dirigidas a este parasita. A detecção de anticorpos circulantes contra *D. immitis* tem sido o método de escolha para os estudos epidemiológicos de DFel (Kramer & Genchi, 2002). Contudo, no presente estudo o teste escolhido, SNAP Triple Feline® concebido para a pesquisa de antígenos de *D. immitis* em gatos, permitindo determinar se os gatos aprenham uma infecção activa, e não tanto avaliar a exposição à infecção como é determinado através da pesquisa de anticorpos.

Neste estudo detectaram-se antígenos de *D. immitis* em quatro das 68 amostras testadas obtendo-se assim uma prevalência de 5,9%. Tal como o obtido no despiste da infecção por *Leishmania* spp., a maioria dos animais positivos (três) pertenciam ao sexo feminino e eram gatos errantes que viviam no exterior (num dos animais errantes não havia informação

disponível mas atendendo ao seu modo de vida tinha ou teve acesso ao exterior). Pelas mesmas razões apontadas anteriormente, também para a infecção por *Dirofilaria immitis* foi difícil relacionar a presença de infecção com o sexo ou o estilo de vida, uma vez que a amostra era composta maioritariamente por animais errantes, e fêmeas, enviesando o estudo. Nenhum dos animais considerados positivos efectuou deslocações, nem se encontravam desparasitados interna e externamente, ou vacinados, o que indica que não eram tomadas quaisquer medidas profiláticas.

Apesar de não existirem referências na literatura científica, tanto quanto sabemos, sobre a relação da infecção por *D. immitis* e a existência de factores imunossupressores, neste estudo observou-se uma associação ($p=0,049$), entre a infecção por *D. immitis* e FeLV. Esta relação deve ser sublinhada pois se para várias variáveis não havia informação disponível, na comparação da relação dirofilária e FeLV, as 68 amostras testadas para dirofilariose foram também testadas para FeLV. Dadas as prevalências determinadas neste estudo para estes vírus de 4,4% (3/68) para a infecção por FIV e 10,3% (7/68) por FeLV, e as prevalências obtidas por outros autores: Almeida (2010) em 86 gatos testados na região de Setúbal detectou infecção por FIV em 15,1% (13/86) dos gatos, e 10,5% (9/86) de gatos infectados por FeLV, Miranda (2011) detectou 26,4% (19/72) gatos infectados com FIV e 19,5% (14/72) com FeLV, de um modo geral, tratam-se portanto de viroses muito prevalentes na população felina portuguesa. Deste modo, a pesquisa de vírus imunossupressores deverá ser incluída em futuros projectos para uma melhor compreensão da sua relação com a DFel.

Mais ainda, num dos gatos errantes co-infectado por *D. immitis*-FeLV também se detectaram anticorpos anti-*Leishmania*.

A prevalência obtida para a infecção por *D. immitis* na região de Olhão foi superior às obtidas, utilizando a mesma metodologia, na região de Setúbal e na Sub-Região do Baixo Vouga onde as prevalências foram de 1,2% (1/86) e 1,4% (1/72) respectivamente (Almeida, 2010; Miranda, 2011). Quando comparada às recentes prevalências determinadas para a população canina residente na região algarvia, encontra-se mais próxima do valor detectado em animais aparentemente saudáveis (5,1%), uma vez que a prevalência determinada para animais com sinais clínicos foi de 17,1% (Cardoso *et al.*, 2012). Não se sabe contudo se estes felinos apresentavam algum sinal compatível com esta parasitose, pois a informação não estava disponível. No entanto, este valor é bem mais elevado que o sugerido por alguns autores que afirmam que a prevalência de infecção por *D. immitis* em gatos para áreas em que a DCan é endémica será de 5 a 10 % da prevalência de infecção observada em cães (Patton & McCracken, 1991; Prieto *et al.*, 2001; Kramer & Genchi, 2002; Simón *et al.*, 2009; Venco *et al.*, 2011). Mas deve ter-se em atenção que mesmo esta prevalência pode estar subestimada pelas limitações do teste, não sendo detectadas infecções constituídas apenas por machos ou por formas imaturas (AHS, 2012).

3. Limitações do estudo

O presente trabalho foi desenvolvido em colaboração com um projecto que conta com a colaboração de várias entidades, como centros de apoio médico-veterinário, associações de protecção dos animais, gatis, canis e envolve vários intervenientes, desde médicos veterinários a investigadores. Deste modo:

a) a recolha e o envio das amostras esteve directamente dependente dos colaboradores da região algarvia, não existindo uma estreita ligação da autora com os proprietários e representantes das entidades intervenientes no projecto, revelando-se também impossível o acompanhamento de animais positivos. Consequentemente, no inquérito utilizado alguns sinais compatíveis com a DFel poderão ter sido subestimados, embora os sinais clínicos mais frequentes (observados também na LFel) estivessem indicados;

b) outro facto a ter em conta é o grau de envolvimento dos participantes, não estando directamente relacionados com o projecto, muitos colaboradores acabaram por enviar amostras com inquéritos parcialmente preenchidos, o que tornou a análise e identificação de possíveis factores de risco muito limitada;

c) relativamente à amostra, esta era maioritariamente constituída por animais errantes, em que os fracos laços afectivos estabelecidos com estes animais não permitem o conhecimento de certas informações, e por outro lado, maioritariamente constituída por fêmeas, por isso não é de excluir a possibilidade de um enviesamento da população amostrada.

Considerações finais

O rastreio efectuado na população felina da região de Olhão demonstrou que os felinos são susceptíveis tanto à infecção por *L. infantum* como por *D. immitis* e que podem ocorrer co-infecções *Leishmania* spp.-*D. immitis*. Mais ainda, as prevalências obtidas para ambas as parasitoses indicam que a população felina do Sul do País se encontra em risco.

Atendendo às considerações feitas, à informação recolhida pelo estudo de vários casos clínicos, rastreios epidemiológicos e estudos experimentais, e aos dados obtidos no presente trabalho, a autora considera a hipótese de que os gatos poderão ter um papel na epidemiologia da leishmaniose. Quanto à importância clínica da infecção, a maioria dos animais considerados positivos apresentava anticorpos e só num caso houve evidência de parasitémia, o que leva a crer que na maioria se tratariam de infecções passadas. Contudo, não havia qualquer informação sobre o quadro sintomatológico destes animais, não sendo por isso possível tirar qualquer ilação acerca da sua importância clínica. Por isso mesmo, é

necessário realizar mais estudos de modo a determinar o verdadeiro papel do gato na manutenção e disseminação da leishmaniose zoonótica.

A detecção de *D. immitis* em quatro gatos é indicativa de que estes animais foram picados por mosquitos culicídeos, infectados com larvas L3 e que no seu organismo o parasita completou o seu desenvolvimento. Além disso, por mais breve e transitória que seja a microfilarémia, estes animais poderiam ter sido infectantes para os vectores, assumindo assim um papel na epidemiologia da dirofilariose. Neste trabalho apenas se pesquisou a presença de antígenos, mas numa próxima fase serão pesquisados anticorpos para analisar o grau de exposição à infecção por *D. immitis* de modo a esclarecer e estabelecer a verdadeira prevalência da dirofilariose na população felina.

Este estudo vem assim realçar a necessidade de alertar a comunidade veterinária e os proprietários para o risco de infecção da população felina por estes dois parasitas, e a necessidade de implementação de medidas profiláticas para proteger animais e pessoas. Embora não existam ainda agentes profiláticos que concedam protecção à população felina contra a infecção por *Leishmania* spp., uma vez que esta espécie é sensível aos piretróides, comumente utilizados em repelentes para cães, esta questão deve ser abordada no futuro para tentar obter produtos alternativos. A protecção contra ectoparasitas merece também a atenção de clínicos e proprietários pela hipótese de que a leishmaniose possa ser transmitida por pulgas e carraças. Por sua vez, a profilaxia contra a infecção por *D. immitis* pode ser realizada com recurso a diferentes princípios activos disponíveis. Por último, e tendo em conta a existência de outras formas de transmissão para ambas as parasitoses, os gatos deverão ser testados quando considerados como potenciais reprodutores ou dadores de sangue.

De uma forma geral, é importante fazer desde já a adequada sensibilização dos profissionais de saúde, médicos veterinários e proprietários dos animais domésticos da região algarvia, acerca do carácter zoonótico destes agentes e da importância de manter os animais livres de infestações por ectoparasitas, e mais uma vez realçar que a LFel e a DFel deveriam passar a ser incluídas sistematicamente, na prática clínica, como diagnóstico diferencial, especialmente, em áreas endémicas de *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp..

BIBLIOGRAFIA

- Afonso, M.O. & Alves-Pires (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In G. Santos-Gomes & I.P. Fonseca, *Leishmaniose Canina*. (pp.27-40). Portugal: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Afonso, M. O. (2011). O papel dos insectos vectores pertencetes à subfamília Phebotominae e família Glossinidae na transmissão de protozoários trypanosomatidae: monitorização e controlo. O efeito das alterações climáticas nas populações vectoriais. *CTA Newsletter – Boletim Informativo do Grupo de Investigação em Ciência e Tecnologia Animal*, número 3, 1-3.
- Al-Kappany, Y.M., Lappin, M.R., Kwok, O.C., Abu-Elwafa, S.A., Hilali, M. & Dubey, J.P. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent *Bartonella* spp., feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and *Dirofilaria immitis* infections in Egyptian cats. *J Parasitol.*, número 97, 256-258. Resumo.
- Almeida, C. (2010). *Prevalência de Dirofilariose Felina na Região do Sado*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Almeida, A.P.G. (2011). Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal. Desafios para o século XXI. *Acta Médica Portuguesa*, número 24, 961-974.
- American Heartworm Society [AHS], 2012. *Current Feline Guidelines*. Acedido em Setembro, 17, 2012, disponível em <http://www.heartwormsociety.org/>
- Atkins, C.E., De Francesco, T.C., Miller, M.W., Meurs, K.M. & Keene, B. (1998). Prevalence of heartworm infection in cats with signs of cardiorespiratory abnormalities. *J Am Vet Med Assoc.*, número 212, 517-520. Resumo.
- Arther, R.G., Bowman, D.D., McCall, J.W., Hansen, O. & Young, D.R. (2003). Feline Advantage Heart™ (Imidacloprid and Moxidectin) Topical Solution as Monthly Treatment for Prevention of Heartworm Infection (*Dirofilaria immitis*) and Control of Fleas (*Ctenocephalides felis*) on Cats. *Parasitol Res*, número 90, 137-139. Referência:10.1007/s00436-003-0917-3.
- Arther, R.G., Atkins, C., Ciszewski, D.K., Davis, W.L., Ensley, S.M. & Settje, T.L. (2005). Safety of imidacloprid plus moxidectin topical solution applied to cats heavily infected with adult heartworms (*Dirofilaria immitis*). *Parasitol Res* número 97, 70-75. Referência: 10.1007/s00436-005-1447-y.
- Atkins, C.E., Arther, R.G., Ciszewski, D.K., Davis, W.L., Ensley, S.M., Guity, P.S., Chopade, H., Hoss, H. & Settje, T.L. (2008). Echocardiographic quantification of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats. *Veterinary Parasitology*, número 158, 164-170. Referência: 10.1016/j.vetpar.2008.09.003.
- Ayllón, T., Tesouro, M.A., Amusategui, I., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F. & Sainza, A. (2008). Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. *Animal biodiversity and emerging diseases*. Referência: 10.1196/annals.1428.019.
- Ayllón, T., Diniz, P.P.V., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2011). Vector-Borne Diseases in Client-Owned and Stray Cats from Madrid, Spain. *Vector-borne and zoonotic diseases*. Referência: 10.1089/vbz.2011.0729.

- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, volume 24, número 7, 324-330.
- Barnes, J.C., Stanley, O., Craig, T.M. (1993). Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* número 202, 416-418. Resumo.
- Bazzocchi, C., Cecilian, F., McCall, J.W., Ricci, I., Genchi, C. & Bandi, C. (2000). Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, número 267, 2511-2516. Referência: 10.1098/rspb.2000.1313.
- Berdoulay, P., Levy, J.K., Snyder, P.S., Pegelow, M.J., Hooks, J.L., Tavares, L.M., Gibson, N.M., Salute, M.E. (2004). Comparison of serological tests for the detection of natural heartworm infection in cats. *J Am Anim Hosp Assoc.*, número 40, 376-384. Resumo.
- Birchard, S.J. & Bilbrey, S.A. (1990). Chylothorax associated with dirofilariasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc.*, número 197, 507-509. Resumo.
- Câmara Municipal de Olhão [CMO] (2012). Município de Olhão. Acedido em Julho 6, 2012, em <http://www.cm-olhao.pt/conhecer-olhao>.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratlong, F., Dedet, J.P., Abranches, P. (1994). The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, número 1, 391-392.
- Campino, L. & Abranches, P. (2002). Leishmaniose cutânea: Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa*, número 15, 387-390.
- Campino, L., Bajanca, R., Franca, I., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Fiadeiro, T. (2005). Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, número 18, 475-478.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, L.-A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O. & Dedet, J.P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, volume 11, número 11, 1708-1714. Referência: 10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*, número 23, 859-864.
- Cancrini, G. & Gabrielli, S. (2007). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *Ivis Publications*, pp. 49-58. Acedido em Setembro, 18, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/cancrini1.pdf>
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol.*, número 121, 21-32.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Neto, F., Kroon, N., Rodrigues, M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.*, número 91, 95-100. Resumo.

- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K., Schallig, H. & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, número 174, 37-42. Referência:10.1016/j.vetpar.2010.08.022.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Carvalho, L. M. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, número 5:62. Referência:10.1186/1756-3305-5-62.
- Carreira, J.M. (2012). Determinação da prevalência da leishmaniose felina na área metropolitana de Lisboa. Monografia do 3.º ano do Curso de Ciências Biomédicas da Universidade do Algarve. Faro: Universidade do Algarve.
- Carleton, R.E. & Tolbert, M.C. (2004). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Veterinary Parasitology*, número 119, 319-326.
- Coelho, W.M.D., Richini-Pereira, V.B., Langoni, H., Bresciani, K.D.S. (2010). Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina municipality; São Paulo state; Brazil. *Veterinary Parasitology*. Referência:10.1016/j.vetpar.2010.10.052.
- Coelho, W., Lima, V., Talamini do Amarante, A., Langoni, H., Pereira, V., Abdelnour, A. & Bresciani, K. (2010). Ocorrência de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em gato doméstico (*Felis catus*) em Andradina, São Paulo, Brasil: relato de caso. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*, volume 19, número 4, 256-258.
- Coelho, W., Amarante, A., Apolinário, J., Coelho, N., Lima, V., Perri, S., Bresciani, K. (2011). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res*, número 109, 1009-1013. Referência: 10.1007/s00436-011-2461-x.
- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J. & Campino, L. (2004) PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, número 98, 12-17.
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J., Pratlong, F., Dedet, J. & Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, número 55, 277-283.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007) Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*, número 13, 1431-1432.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in na endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 1-8. Referência: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.028>.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* volume 10, númro 128, 149-155. Resumo.
- Cornegliani, L., Vercelli, A., Bo, S. & Colombo, S. (2003). Two cases of cutaneous nodular dirofilariasis in the cat. *J Small Anim Pract.*, número 44,316-318. Resumo.

- Craig, T.M., Barton, C.L., Mercer, S.H., Droleskey, B.E. & Jones, L.P. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, número 35, 1100-1102. Resumo.
- Dahroug, M.A.A., Almeida, A.B.P.F., Sousa, V. R.F., Dutra, V., Turbino, N.C.M.R., Nakazato, L. & Souza, R. L. (2010). *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, número 104, 73-74. Referência:10.1016/j.trstmh.2009.08.003.
- Dahroug, M.A.A., Almeida, A.B.P.F., Sousa, V. R.F., Dutra, V., Guimarães, L.D., Soares, C.E., Nakazato, L. & Souza, R. L. (2011). The first case report of *Leishmania (leishmania) chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 249-250.
- Day, M. J. (2011). *One health: the importance of companion animal vector-borne diseases*. Acedido em Mai. 26, 2012, disponível em <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/49> Referência: 10.1186/1756-3305-4-49.
- Deem, S.L., Heard, D.J. & La Rock, R. (1998). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease and glomerulonephritis in a black-footed cat (*Felis nigripes*). *J Zoo Wildl Med.*, número 29, 199-202. Resumo.
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K.(2009). Specific anti-Leishmania spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Referência:10.1016/j.jfms.2008.01.009
- Dingman, P., Levy, J.K., Kramer, L.H., Johnson, C.M., Lappin, M.R., Greiner, E.C., Courtney, C.H., Tucker, S.J., Morchón, R. (2010). Association of *Wolbachia* with heartworm disease in cats and dogs. *Veterinary Parasitology*, número 170, 50-60. Referência:10.1016/j.vetpar.2010.01.037.
- Dillon, A.R., Warner, A.E., Brawner, W., Hudson, J. & Tillson, M. (2008). Activity of pulmonary intravascular macrophages in cats and dogs with and without adult *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, número 158, 171-176. Referência:10.1016/j.vetpar.2008.09.004.
- Dillon, R. (2012). *Sandfly*. Acedido em Jul. 16, 2012, disponível em: <http://roddillon.com/dillons-sand-fly-research/>
- Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (2008). Caracterização do Aproveitamento Hidroagrícola do Sotavento Algarvio. Lisboa: DGADR.
- Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I.M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Fazendeiro, M.I., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, número 12, 441-446. Referência:10.1016/j.jfms.2009.11.003.
- Faria, T.C.P. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Fernandez, C., Chikweto, A., Mofya, S., Lanum, L., Flynn, P., Burnett, J.P., Doherty, D., Sharma, R.N. (2010). A serological study of *Dirofilaria immitis* in feral cats in Grenada, West Indies. *J Helminthol.*, número 84, 390-393. Resumo.

- Ferreira, E., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A., Paes, D., Silva, E., Schallig, H. & Gonijo, C. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, número 146, 235-241. Referência: 10.1016/j.vetpar.2007.02.015.
- Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.*, volume 28, número 165, 150-154. Resumo.
- Figueiredo, F., Bonnal, I., Nascimento, L., Costal, T., Baptista, C., Pacheco, T., Amendoeira, M. & Madeira, M. (2009). Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, volume 42, número 2. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000200009>.
- Fisher, M. A. & Shanks, D. J. (2008). A review of the off-label use of selamectin (Stronghold®/Revolution®) in dogs and cats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, volume 50, número 46, 1-5. Referência:10.1186/1751-0147-50-46.
- Genchi, C., Cody, R., Pengo, G., Büscher, G., Cavalleri, D., Bucci, V. & Junquera, P. (2004). Efficacy of a single milbemycin oxime administration in combination with praziquantel against experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. *Veterinary Parasitology*, número 122, 287-292.
- Genchi, C.; Rinaldi, L.; Cringoli, G. (2007). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *Ivis Publications*, pp. 129-132. Acedido em: <http://www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/venco2.pdf>
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G. (2008). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe, *Veterinary Parasitology*. Referência:10.1016/j.vetpar.2009.03.026.
- Genchi, C., Venco, L., Ferrari, N., Mortarino, M. & Genchi, M. (2008). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: A statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats. *Veterinary Parasitology*, número 158, 177-182. Referência:10.1016/j.vetpar.2008.09.005)
- Glaus, T.M., Jacobs, G.J., Rawlings, C.A., Watson, E.D. & Calvert, C.A. (1995). Surgical removal of heartworms from a cat with caval syndrome. *J Am Vet Med Assoc.*, volume 1, número 206, 663-666. Resumo.
- Gomes, L.A., Serrão, M.L., Duarte, R., Bendas, A. & Labarthe, N. (2007). Attraction of mosquitoes to domestic cats in a heartworm enzootic region. *J Feline Med Surg.*, número 9, 309-312. Resumo.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.*, número 35, 1169-1180. Resumo.
- Gramiccia & Gradoni (2007). The leishmaniasis of Southern Europe. In W. Takken & B.G.J. Knols (Eds.), *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe* (pp. 75-90). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, número 181, 23-30. Referência:10.1016/j.vetpar.2011.04.019.

- Grevot, A., Jaussaud, H. P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas, P., Breton, C. & Bourdoiseau, G. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, número 12, 271-275.
- Hatam, G.R., Adnani, S.J., Asgari, Q., Fallah, E., Motazedian, M.H., Sadjjadi, S.M. & Sarkari, B. (2009). First Report of Natural Infection in Cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector-borne and Zoonotic diseases*. Referência: 10.1089=vbz.2009.0023.
- Hayasaki, M., Okajima, J., Songa, K.H., Shiramizu, K. (2003). Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, número 111, 267-271.
- Helhazar, M. F. (2012). Avaliação do papel dos roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* como hospedeiros reservatórios de *Leishmania infantum* nos concelhos de Sesimbra e Sintra. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Hemmersbach-Miller, M., Delmont, J., Hours, C. & Brouqui, P. (2005). Pseudo-tumor of the lung, a rare clinical presentation of dirofilariasis. *Presse Med*, número 34, 109-110.
- Hermesmeyer, M., Limberg-Child, R.K., Murphy, A.J. & Mansfield, L.S. (2000). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection among shelter cats. *J Am Vet Med Assoc*, número 217, 211-212. Resumo.
- Hervás, J., Chacón-M De Lara, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J.A. & Gómez-Villamandos, J.C. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J. Fel. Med. Surg.*, número 1, 101-105. Resumo.
- <http://www.tellmepinkorblue.com/Gender-Testing-DNA-Laboratory.php>; acedido em Julho, 8, 2012.
- <http://www.clker.com/clipart-eppendorf-tube-pale-yellow.html>; acedido em Julho, 8, 2012.
- <http://www.kit.nl/kit/Leishmaniasis-diagnostics>; acedido em Julho, 8, 2012.
- IDEXX, 2012. Acedido em Abr. 16, 2012, disponível em www.idexx.com.
- Iizuka, T., Hoshi, K., Ishida, Y. & Sakata, I. (2009). Right Atriotomy Using Total Venous Inflow Occlusion for Removal of Heartworms in a Cat. *J. Vet. Med. Sci.*, número 71, 489-491.
- Kalkstein, T.S., Kaiser, L. & Kaneene, J.B. (2000). Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan. *J Am Vet Med Assoc*, volume 15, número 217, 857-861. Resumo.
- Kendall, K., Collins, G.H. & Pope, S.E. (1991). *Dirofilaria immitis* in cats from inner Sydney. *Aust Vet J*. 1991, número 68, 356-357. Resumo.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*, número 17, 279-289.
- Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P. & Goldschmidt, M.H. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. *J. Exp. Parasitol.*, número 58, 125-131. Resumo.

- Kramer, L. & Genchi, C. (2002). Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary Parasitology*, número 104, 43-50.
- Labarthe, N., Ferreira, A.M.R., Guerrero, J., Newcomb, K. & Paes-de-Almeida, E. (1997) Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. *Veterinary Parasitology*, número 71, 301 -306.
- Labarthe, N. & Guerrero, J. (2005). Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico? *Veterinary Parasitology*, número 133, 149-156.
- Le Fichoux, Y., Quaranta, J-F., Aufeuvre, J-P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D. & Kubar, J. (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, volume 37, número 6, 1953-1957.
- Lee, A.C.Y & Atkins, C.E. (2010). Understanding Feline Heartworm Infection: Disease, Diagnosis, and Treatment. *TOPICAL REVIEW*, volume 25, número 4, 224-230. Referência:10.1053/j.tcam.2010.09.003.
- Ledesma, N. & Harrington, L. (2011). Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*, volume 26, número 4, 178-185. Referência:10.1053/j.tcam.2011.09.005.
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T., Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet Ophthalmol.*, número 8, 71-75. Resumo.
- Levy, J.K., Lappin, M.R., Glaser, A.L., Birkenheuer, A.J., Anderson, T.C., Edinboro, C.H. (2011). Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *JAVMA*, volume 238, Número 3, 311-317.
- Litster, A., Atkins, C. & Atwell, R. (2008). Acute death in heartworm-infected cats: Unraveling the puzzle. *Veterinary Parasitology*, número 158, 196-203. Referência: 10.1016/j.vetpar.2008.09.007.
- Liu, J., Song, K.H., Lee, S.E., Lee, J.Y., Lee, J.I., Hayasaki, M., You, M.J. & Kim, D.H. (2005). Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea. *Veterinary Parasitology*, número130, 125-129.
- Longoni, S., López-Cespedes, A., Sánchez-Moreno, Bolio-Gonzalez, M., Sauri-Arceo, C., Rodríguez-Vivas, R., Martín, C. (2012). Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.04.003> .
- Lukes, J., Mauricio, I.L, Schonian, G., Dujardin, J-C., Soteriadou, K., Dedet, J-P., Kuhls, K., Tintaya, K.W.Q, Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J. & Miles, M.A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *PNAS*, volume 104, número22, 9375-9380. Referência: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703678104.
- Maia, C., Cristóvão, J.M., Ramada, J., Rolão, N. & Campino, L. (2006). Diagnóstico de leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis

de filtro – resultados preliminares. *Veterinary Medicine*, volume 8, número 47, 29-32.

- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2007). Diagnosis of canine leishmaniosis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, número 179, 142-144. Referência: 10.1016/j.tvjl.2007.08.009.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES*, volume 8, número 4, 555-559.
- Maia, C & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.
- Maia, C. (2008). Interação Parasita-Hospedeiro e susceptibilidade de *Leishmania infantum* a fármacos. Tese de Doutoramento. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2010.08.030.
- Maia, C. & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, volume 27, número 8, 341-344. Referência: 10.1016/j.pt.2011.03.008.
- Maia, C. & Campino, L. (2012). Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *Journal of Tropical Medicine*, volume 2012, número 541571, 1-7. Referência: 10.1155/2012/541571.
- Mancianti, F., Mignone, W. & Galastri, F. (1994). Serologic Survey for Leishmaniasis in Free-living Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, volume 30, número 3, 454-456.
- Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*, número 46, 203-206. Resumo.
- Manfredi, M., Cerbo, A & Genchi, M. (2007). Chapter 2: Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Ivis Publications*, pp. 41-45. Acedido em Setembro, 17, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/manfredi1.pdf>
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A.C., Montenegro, L. & Roccabianca, P. (2009). Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.*, número 38, 201-205. Resumo.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007) Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, número 145, 357-360.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Luvás, G., Paltrinieri, S., Roura, X., Zini, E. & Zatelli, A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, volume 236, numero 11, 1200-1206.
- Martins, T.S.O. (2011). Detecção de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma*, *Haemofelis* e *Leishmania infantum* em felinos errantes e sua relação

com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, número 145, 267-273.
- Mazzariol, S., Cassini, R., Voltan, L., Aresu, L. & di Regalbono, A.F. (2010). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in a leopard (*Panthera pardus pardus*) housed in a zoological park in north-eastern Italy. *Parasites & Vectors*, volume 3, número 25, 1-4. Referência: 10.1186/1756-3305-3-25.
- McCown, M. & Grzeszak, B. (2010) Zoonotic and Infectious Disease Surveillance in Central America: Honduran feral cats positive for *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Rickettsia*, and Lyme disease. *J Spec Oper Med.*, número 3, 41-43.
- Miranda, B.O. (2011). *Contribuição para o estudo da prevalência de Dirofilariose Felina na Sub-Região do Baixo Vouga*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Monteiro, 2007. *Parasitologia Veterinária UFSM (2.ª edição)*. Acedido em Setembro, 17, 2012, disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/64301612/Parasitologia#page=215~>
- Montoya-Alonso, J.A., Mellado, I., Carretón, E., Cabrera-Pedrero, E.D., Morchón, R. & Simón, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, número 107, 1265-1269. Referência: 10.1007/s00436-010-1987-7.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R. & Simón, F. (2011). Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Veterinary Parasitology*, número 176, 291-294. Referência: 10.1016/j.vetpar.2011.01.011.
- Morchón, R., Ferreira, A.C., Martín-Pacho, J.R., Montoya, A., Mortarino, M., Genchi, C. & Simón, F. (2004). Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary Parasitology*, número 125, 313-321.
- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J. & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe –new distribution trends. *Frontiers in Parasitology* Volume 3, número 196, 1-11. Referência: 10.3389/fphys.2012.00196.
- Morsy, T.A., Al-Dakhil, M.A., El-Bahrawy, A.F. (1999). Natural *Leishmania* infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.*, número 29, 69-74. Resumo.
- Nasereddin, A., Salant, H. & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. *Veterinary Parasitology*, número 158, 364-369.
- Navarro, J.A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *J. Comp. Path.*, volume 143, 297-302. Referência: 10.1016/j.jcpa.2010.03.003.

- Nelson, R.W., Couto, C.G., Grauer, Hawkins, Johnson, Lappin, Scott-Moncrieff, Taylor, Ware, Watson & Willad. (2010). *Medicina Interna de Pequenos Animais*. (tradução da 4.^a ed) Brasil: Elsevier Editora Ltda.
- Neto, L.d.S., Sobrinho, L., Martins, C., Machado, R., Marcondes, M. & Lima, V. (2010). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Vet.Parasitol.* Referência:10.1016/j.vetpar.2010.11.055.
- Niatiegala (2012). *Parasitology*. Acedido em Ago. 16, 2012, disponível em <http://s27.photobucket.com/albums/c185/niatiegala/Parasitology/>
- Nogami, S. & Sato, T. (1997). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Saitama, Japan. *J Vet Med Sci.*, número 59, 869-871. Resumo.
- Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, E., Harasawa, R. & Nakagaki, K. (2000). Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. *Veterinary Parasitology*, número 92, 227-232.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Suvannadabba, S. & Poovorawan, Y. (2006). Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. *Veterinary Parasitology*, número 140, 366-372. Referência:10.1016/j.vetpar.2006.04.003.
- Oliva, G., Roua, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A. & Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, volume 236, número 11, 1192-2010.
- Oliveira, P. (2010). Considerações sobre o clima do Algarve. Algarve: DRAP Algarve.
- Organização Mundial da Saúde [OMS] (2010). *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010*. Switzerland: WHO technical report series, número 949.
- Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, número 3:2. Referência:10.1186/1756-3305-3-2.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelièvre, A. & Hass, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology*, número 75, 273-277.
- Pampiglione, S., Rivasi, F. & Gustinelli, A. (2009). Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology*, número 54, 192-204. Referência: 10.1111/j.1365-2559.2008.03197_a.x.
- Patton, S. & McCracken, M.D. (1991). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cats and Dogs in Eastern Tennessee. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, número 3, 79-80. Referência: 10.1177/104063879100300118.
- Pennissi, M. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. *Intervet International Boxmeer*, R. Killick-Kendrick editors, Barcelona, pp. 39-48.
- Pocholle, E., Reyes-Gomez, E., Giacomo, A., Delaunay, P., Hasseine, L., Marty, P. (2012). A case of feline leishmaniasis in the south of France. *Parasite.*, número 19, 77-80. Resumo.

- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, número 106, 181-191.
- Prieto, C., Venco, L., Simon, F. & Genchi, C. (1997). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections. *Veterinary Parasitology*, número 70, 209-217.
- Prieto, G., Simón, F., Genchi, C., McCall, J.W. & Venco, L. (1999). Utility of adult antigens of *Dirofilaria immitis* for the early detection of dirofilariosis and for the evaluation of chemoprophylactic treatment in experimentally infected cats. *Veterinary Parasitology*, número 86, 5-13.
- Prieto, G., McCall, J.W., Venco, L., Genchi, M., Simón, F., Genchi, C. (2001). IgG response against infective larvae of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats. *Vet. Res.*, número 32, 93-96.
- Prieto, G., Cecilian, F., Venco, L., Morchón, R. & Simón, F. (2002). Feline dirofilariosis: antibody response to antigenic fractions containing specific 20 to 30 kDa polypeptides from the adult *Dirofilaria immitis* somatic antigen. *Veterinary Parasitology*, número 103, 341-353.
- Quinnell, R.J. & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Journals Cambridge University, páginas 1-20. Referência: 10.1017/S0031182009991156.
- Ravel, S., Cuny, G., Reynes, J. & Veas, F. (1995). A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Tropica*, número 59, 187-196.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. & Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, número 12, 183-186.
- Roncalli, R.A., Yamane, Y. & Nagata T. (1998). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats in Japan. *Veterinary Parasitology* número 75, 81-89.
- Rosa, N.J.G.C. (2009). Rastreio de Dirofilariose e Leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rougeron, V., Catzefflis, F., Hide, M., De Meeûs, T., Bañulsa, A-L. (2011). First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. *Veterinary Parasitology*, número 181, 325-328.
- Rufenacht, S., Sager, H., Müller, N. et al. (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Veterinary Record*, número 156, 542-545.
- Sanches, A., Cardoso, C., Pereira, A. & Carvalho, J. (2009). Um caso de leishmaniose felina. In Proceedings of 18º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia (APMVEAC) – Livro de resumos: comunicações livres: painel (CD), Lisboa, 29-31 Maio 2009.
- Savani, E., Camargo, M., Carvalho, M., Zampieri, R., Santos, M., D'Áuria, S., Shaw, J., & Floeter-Winter, L. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from

Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, número 120, 229-233.

- Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F, Santos, I.B., Andrade, M.V., Cuzzi, T., Marzochi, M.C.A. & Schubach, A. (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Tropical Medicine and Hygiene*, número 98, 165-167.
- Schwan, E.V., Miller, D.B., Kock, D. & Heerden, A. (2000). *Dirofilaria repens* in a cat with acute liver failure. *J S Afr Vet Assoc.*, número 71, 197-200. Resumo.
- Semião-Santos, S.J., el Harith, A., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C. & Gusmão, R. (1995). Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res.*, número 81, 235-239. Resumo.
- Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2010). A Serological and Molecular Study of *Leishmania infantum* Infection in Cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector-borne and zoonotic diseases*. Referência: 10.1089/vbz.2009.0251.
- Silva, A.V.M., Cândido, C.D.S., Pereira, D.P., Brazil, R.P. & Carreira, J.C.A. (2008). The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*, número 105, 92-94. Resumo.
- Silva, S.M., Rabelo, P.F.-B., Gontijo, N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M., Michalick, M.S.M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2010.08.005.
- Simón, F., Kramer, L.H., Román, A., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Grandi, G. & Genchi, C. (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. *Veterinary Research Communications*, número 31, 161-171. Referência: 10.1007/s11259-006-3387-0.
- Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C. & Siles-Lucas, M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in Parasitology* volume 25, número 9, 1-6. Referência: 10.1016/j.pt.2009.06.003.
- Snyder, P.S., Levy, J.K., Salute, M.E., Gorman, S.P., Kubilis, P.S., Smail, P.W & George, L.L. (2000). Performance of serologic tests used to detect heartworm infection in cats. *J Am Vet Med Assoc.*, número 216, 693-700. Resumo.
- Sobrinho, L., Rossi, C., Vides, J., Braga, E., Gomes, A., Lima, V., Perri, S., Generoso, D., Langoni, H., Leutenegger, C., Biondog, A., Laurenti, M., Marcondes, M. (2012). Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, número 187, 302- 306. Referência: 10.1016/j.vetpar.2012.01.010.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F, Teixeira, M.J, Oliveira-Lima, J.W., Bevilacqua, C.M.L, Prata-Júnior, R.C, Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S, Coêlho, Z.C.B., Coêlho, I.C.B, Barral, A. & Pompeu, M.M.L. (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, número 127, 199-208. Referência: 10.1016/j.vetpar.2004.10.008.

- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, número 76, 676-680.
- Sousa, S., Blanco, A.S., Teixeira, L., Madeira de Carvalho, L. (2008). Leishmaniose canina no distrito de Coimbra. *Congresso Ciências Veterinárias 2008 – Livro de Resumos*.
- Sousa, S., Lopes, A., Cardoso, L., Silvestre, R., Schallig, H., Reed, S., Silva, A. (2011). Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica*, número 120, 82-87. Referência: 10.1016/j.actatropica.2011.06.003.
- Souza, A., Barros, E., Ishikawa, E., Ilha, I., Marin, G. & Nunes, E. (2005). Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, número 128, 41-45.
- Sukhumavasi, W., Bellosa, M.L., Lucio-Forster, A., Liotta, J.L., Lee, A.C.Y, Pornmingmas, P., Chungpivat, S., Mohammed, H.O., Lorentzen, L., Dubey, J.P. & Bowman, D.D. (2012). Serological survey of *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2012.02.021.
- Tabar, M-D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2008). Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, número 151, 332-336. Referência: 10.1016/j.vetpar.2007.10.019.
- Taylor, M.M.A., Coop, R.L., Lioyd, S. & Jacobs, D.E. (2001). Parasites of pets animals: progress and new hazards. *TRENDS in Parasitology*, volume 17, número 2, 57-58.
- Tarello, W. (2011). Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990–2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*, volume 2011, artigo ID 578385, 1-7. Referência: 10.1155/2011/578385.
- Trainor, K.E., Porter, B.F., Logan, K., S., Hoffman, R.J. & Snowden, K.F. (2010). Eight Cases of Feline Cutaneous Leishmaniasis in Texas. *Vet Pathol*, número 47. Referência: 10.1177/0300985810382094.
- Traversa, D., Aste, G., Milillo, P., Capelli, G., Pampurini, F., Tunesi, C., Santori, D., Paoletti, B. & Boari, A. (2010). Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. *Veterinary Parasitology*, número 169, 128-132. Referência: 10.1016/j.vetpar.2009.12.034.
- Traversa, D., Di Cesare, A. & Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. Referência: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/62>.
- Urquhart, G.; Armour, J.; Duncan, J.; Dunn, A.; Jennings, F. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2th ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S.A.
- Vides, J., Schwardt, T., Sobrinho, L., Marinho, M., Laurenti, M., Biondo, A., Leutenegger, C. & Marcondes, M. (2011). *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, número 178, 22-28.

- Venco, L., Genchi, C., Genchi, M., Grandi, G. & Kramer, L.H (2008). Clinical evolution and radiographic findings of feline heartworm infection in asymptomatic cats. *Veterinary Parasitology*, número 158, 232-237. Referência:10.1016/j.vetpar.2008.09.011.
- Venco, L., Mortarino, M., Carro, C., Genchi, M., Pampurini, F. & Genchi, C. (2008). Field efficacy and safety of a combination of moxidectin and imidacloprid for the prevention of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary Parasitology*, número 154, 67-70. Referência: doi:10.1016/j.vetpar.2008.02.020.
- Venco, L., Genchi, M., Genchi, C., Gatti, D. & Kramer, L. (2011). Can heartworm prevalence in dogs be used as provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats? *Veterinary Parasitology*, número 176, 300-303. Referência: 10.1016/j.vetpar.2011.01.013.
- Villarreal, M.N. (2008). *Leishmaniasis life cycle*. Acedido em Ago. 16, 2012, disponível: <http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania>.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, volume 2, número 29, 319-321. Referência: 10.1007/s11259-005-0071-8.
- Willard, M.D., Roberts, R.E., Allison, N., Grieve, R.B. & Escher, K. (1988). Diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Dirofilaria immitis* infections in cats from a human shelter. *J Am Vet Med Assoc.*, número 192, 913-916. Resumo.

Anexo I – Casuística observada durante o período de estágio curricular no Hospital Escolar da FMV-UTL.

Tabela 6 – Descrição da casuística das intervenções cirúrgicas observadas durante o período de estágio ao serviço de Cirurgia.

Intervenção cirúrgica	Espécie	Nº de casos
Aborto	Gatos	1
Amputação de membros	Cães	2
Biopsia intestinal	Cães	1
	Gatos	1
Biopsia óssea e resolução de bursite	Cães	1
Cesariana	Cães	2
Cistotomia	Cães	1
Correcção de entrópiön	Cães	2
Destartarização	Cães	4
	Gatos	1
Enterectomia	Gatos	1
Enterotomia por corpo estranho	Cães	1
Esplenectomia	Cães	5
Exérese de nódulos cutâneos	Cães	9
Exodontia	Cães	3
	Gatos	1
Gastrotomia por corpo estranho	Cães	1
Hemilaminectomia	Cães	4
Herniorrafia	Cães	1
Laparotomia exploratória	Cães	4
Lobectomy hepática	Cães	2
Mastectomy	Cães	5
	Gatos	2
Nefrectomia	Cães	1
Orchiectomy	Cães	4
	Gatos	7
Ovariohisterectomia	Cães	13
	Gatos	5
Remoção de placas fixadoras	Cães	2
Resolução da ruptura do ligamento cruzado por TTA - "tibial tuberosity advancement"	Cães	5

Tabela 6 – Descrição da casuística das intervenções cirúrgicas observadas durante o período de estágio ao serviço de Cirurgia (continuação).

Intervenção cirúrgica	Espécie	Nº de casos
Resolução de fractura	Cães	9
	Gatos	3
Resolução de otodematoma	Cães	1
Ressecção da cabeça do fémur	Cães	3
	Gatos	1
Total		109

Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas.

Área clínica	Espécie Animal	Diagnóstico	N.º de Casos	N.º de casos por área
Cardiologia	Cães	Cardiomiopatia dilatada	1	11
		Efusão pericárdica	2	
		Endocardiose da mitral	3	
		Insuficiência cardíaca congestiva	3	
	Gatos	Cardiomiopatia hipertrófica	2	
Dermatologia	Cães	Demodicose	2	37
		Dermatite alérgica à picada de pulga (DAPP)	3	
		Dermatite atópica	5	
		Dermatite piotraumática ("Hot spots")	3	
		Dermatofitose	2	
		Fístula Perianal	2	
		Ictiose	1	
		Otite externa por <i>Malassezia</i> sp.	4	
		Piodermatite	1	
	Cobaios	Pododermatite	3	
	Cobras	Queimaduras cutâneas	1	
	Gatos	Acne felino	3	
		Alopécia	1	
		Dermatite miliar	1	
		Dermatofitose	3	
		Fístula perianal	1	
	Ratos	Dermatite por <i>Malassezia</i> sp.	1	

Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas (continuação).

Área clínica	Espécie Animal	Diagnóstico	N.º de Casos	N.º de casos por área
Doenças Infecciosas	Cães	Dirofilariose	1	35
		Ehrlichiose	2	
		Leishmaniose	5	
		Leptospirose	2	
		Parvovirose	4	
		Tosse do canil	1	
	Gatos	Peritonite Infecciosa	2	
		Síndrome Coriza	4	
		Vírus de Imunodeficiência Felina e/ou Vírus de Leucose felina	14	
Endocrinologia	Cães	<i>Diabetes mellitus</i>	5	16
		Hiperadrenocorticism	2	
		Hipoadrenocorticism	2	
		Hipotiroidismo	2	
		Insulinoma	2	
	Gatos	<i>Diabetes mellitus</i>	2	
Estomatologia	Cães	Abcesso dentário	1	5
		Rânula	1	
	Chinchila	Sobrecrescimento dentário e abcesso	1	
	Gatos	Doença periodontal grave	1	
		Abcesso dentário	1	
Gastroenterologia	Cães	Colite ulcerativa por Ptiose	1	31
		Diarreia por indiscrição alimentar	1	
		Dilatação/Torção gástrica	2	
		Fecaloma	1	
		Gastroenterite	4	
		Ingestão de corpo estranho	2	
		Megacólon	1	
		Pancreatite	1	
		Parasitismo intestinal	2	
		Peritonite	2	
		Doença inflamatória intestinal (IBD)	1	
		Outros	2	
	Chinchila	Atonia intestinal	1	
	Gatos	Lipidose hepática	3	
		Pancreatite	3	
		Outros	2	

Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas (continuação).

Área clínica	Espécie Animal	Diagnóstico	N.º de Casos	N.º de casos por área
Gastroenterologia	Sáurio	Anorexia	1	
	Psitacídeo	Gastroenterite	1	
Hematologia e Imunologia	Cães	Anemia hemolítica auto-imune	2	4
	Gatos	Policitémia	1	
		Anemia por carência de ferro	1	
Neurologia	Cães	Epilepsia Idiopática	2	9
		Hérnia discal	3	
		Meningite	1	
		Poliradiculoneuropatia periférica	1	
	Gatos	Síndrome vestibular Central	1	
	Leporídeos	Síndrome vestibular Central	1	
Oftalmologia	Cães	Cataratas	6	21
		Entrópion	2	
		Glaucoma	1	
		Hipertensão ocular	1	
		Prolapso da glândula de Harder	1	
		Querato-conjuntivite seca	4	
		Úlcera da córnea	1	
	Gatos	Uveíte bilateral	2	
		Úlcera da córnea	1	
		Uveíte bilateral	1	
Oncologia	Cães	Quelónios	Blefarite por Hipovitaminose A	1
		Adenoma das glândulas hepatóides	1	43
		Epulide	3	
		Hemangiossarcoma	2	
		Histiocitoma	1	
		Linfoma	1	
		Lipoma	5	
		Mastocitoma	6	
		Melanoma maligno cutâneo e ósseo	1	
		Neoplasia cerebral	2	
		Neoplasia mamária	10	
		Neoplasia uterina	1	
		Neoplasias indiferenciadas	2	
		Plasmocitoma	1	

Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas (continuação).

Área clínica	Espécie Animal	Diagnóstico	N.º de Casos	N.º de casos por área
Oncologia	Gatos	Carcinoma espinocelular	1	
		Fibrossarcoma	1	
		Linfoma	2	
		Neoplasia mamária	3	
Ortopedia	Cães	Artrose geriátrica	3	25
		Displasia da anca	4	
		Displasia do cotovelo	1	
		Fractura da tíbia e fíbula	1	
		Fractura da ulna	1	
		Fractura do fémur	1	
		Fractura do úmero	1	
		Fractura dos metacarpos	1	
		Lesão/inflamação nos meniscos	1	
		Luxação coxo-femoral	2	
		Ruptura do ligamento cruzado anterior	5	
	Gatos	Discoespondilite anquilosante	1	
		Fractura do fémur e da bacia	1	
	Psitacídeos	Fractura do radio e ulna	1	
		Fractura do radio, ulna, fémur	1	
Pneumologia	Cães	Derrame pleural	2	12
		Hérnia diafragmática	1	
		Pneumonia	1	
	Gatos	Asma felina	1	
		Derrame pleural	2	
		Hérnia diafragmática	1	
		Pneumonia	2	
		Quilotórax	2	
Reprodução e Obstetrícia	Cães	Diagnóstico de Gestação	1	12
		Piometra	1	
		Prostatite/Hiperplasia Benigna da Próstata	2	
		Pseudogestação	3	
		Testículo ectópico	3	
	Gatos	Piometra	1	
		Testículo ectópico	1	
Traumatologia	Cães	Politraumatizados	4	9
		Lacerações	1	
	Gatos	Politraumatizados	3	
		Lacerações	1	

Tabela 7 – Descrição da casuística referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas (continuação).

Área clínica	Espécie Animal	Diagnóstico	N.º de Casos	N.º de casos por área
Urologia/ Nefrologia	Cães	Cistite	2	23
		Insuficiência Renal Crónica (IRC)	5	
		Infecção do tracto urinário (ITU)	1	
		Pielonefrite	1	
		Prostatite	1	
		Urólitos	2	
	Gatos	Cistite	1	
		Doença do tracto urinário inferior (FLUTD)	4	
		IRC	5	
	Leporídeos	Urólitos	1	
Total			293	

Tabela 8 – Descrição da casuística acompanhada referente ao período de estágio ao serviço das Consultas Externas na especialidade de Dermatologia.

Entidades Clínicas	N.º	
	Cães	Gatos
Abcesso	1	
Acne do mento		1
Adenite sebácea	1	
Alopécia	2	
Alopécia por diluição de cor	1	
Alopécia sazonal	1	
Calcinose Cutânea	1	
Cornos de queratina		1
Demodecose	4	
Dermatite a <i>Malassezia</i> spp.	9	
Dermatite alérgica à picada de pulga	4	2
Dermatite atópica	26	6
Dermatite bacteriana	5	1
Dermatite miliar		1
Dermatite mucocutânea	1	
Dermatite piotraumática ("Hot spots")	1	
Dermatofitose	1	1
Fístulas das Glândulas perianais	2	
Granuloma eosinofílico		3
Hipotiroidismo	1	
Impetigo juvenil	1	
Mucínose cutânea	1	
Otite externa	5	
Piodermatite profunda	1	
Pododermatite por <i>Malassezia</i> spp.	1	
Penfigóide bolhoso	1	
Pênfigus foliáceo	3	1
Sarna sarcóptica	2	
Seborreia do bordo das orelhas	1	
Total	77	

Anexo II – Dados de leishmaniose felina registrados na literatura científica.

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica.

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
América Central (Honduras)	2010, a	Sangue	12	25%	IFI	Animais errantes	<i>L. donovani</i>	McCown & Grzeszak, 2010
América do Sul (Guiana Francesa)	2007, b	Zaragatoa cutânea	1		Nested PCR	Acesso ao exterior	complexo <i>L. braziliensis</i>	Rougeron, Catzefflis, Hide, De Meeûs, Bañulsa, 2011
Arábia Saudita	1999, a	Sangue, tecidos (fígado, baço)	10 ¹	40%	Hemaglutinação indirecta, exame citológico	Deserto	<i>Leishmania sp.</i>	Morsy, Al-Dakhil, El-Bahrawy, 1999
Argélia	1912, b	Medula óssea	1		-	Um cão e uma criança com LV	-	Sergent <i>et al.</i> , 1912, citado por Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2007
Argélia	1947, b	Pele	1		Exame citológico	-	-	Bosselut, 1947, revisto por Rosa, 2009
Argentina	1927, -	-	-	-	-	-	<i>L. braziliensis</i>	Mazza, 1927, citado por Ozon <i>et al.</i> , 1998
Brasil	1940, b	Pele, fígado	1		Exame citológico, cultura	-	-	Mello, 1940, revisto por Rosa, 2009
Brasil	1996, b	-	1		PCR	-	<i>Leishmania (Viannia)</i>	Passos <i>et al.</i> , 1996 citado por Poli <i>et al.</i> , 2002
Brasil (São Paulo)	2000, b	Esfregaços cutâneo, de baço e fígado, tecidos (baço e fígado)	1		Exame citológico, cultura, PCR	-	<i>L. chagasi</i>	Savani <i>et al.</i> , 2004
Brasil (Mato Grosso do Sul)	2003, b	PAAF nódulos	1		Exame citológico, xenodiagnóstico, cultura, IFI	-	<i>L. amazonensis</i>	Souza <i>et al.</i> , 2005
Brasil (Rio de Janeiro)	2003, b	-	2		Exame histopatológico, cultura, electroforese isoenzimática	-	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Schubach <i>et al.</i> , 2004
Brasil (Rio de Janeiro)	2005, a	Sangue	43	2,4%	IFI, ELISA	-	<i>L. braziliensis</i>	Figueiredo <i>et al.</i> , 2009

Legenda: a – Rastreo epidemiológico; b – Relato de caso; - ausência de informação; ¹ – espécie *Felis margarita*; ² – 7 animais *Puma concolor*, 5 *Panthera onca*, 4 *Leopardus pardalis*; ³ – *Panthera leo*;

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registro	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Brasil (São Paulo)	2007, a	PAAF linfonodos, tecidos (medula óssea, baço, fígado)	200	6,5%	-	-	<i>Leishmania sp.</i>	Rossi, 2007, citado por Coelho <i>et al.</i> , 2010a
Brasil (Rio de Janeiro)	2008, a	-	-	25%	-	-	-	Silva <i>et al.</i> , 2008
Brasil (Mato Grosso)	2008, a	Sangue, PAAF do linfonodo poplíteo	16 ²	37,5%	PCR-RFLP	Jardim Zoológico	<i>L. chagasi</i>	Dahroug <i>et al.</i> , 2010
Brasil (São Paulo)	2008, b	Sangue, linfonodo	1		Exame citológico, IFI, ELISA	-	-	Serrano <i>et al.</i> , 2008, revisto por Rosa, 2009
Brasil (São Paulo)	2009, b	Sangue, linfonodos, fígado	2		Exame citológico, exame histopatológico, IFI, ELISA, PCR	-	-	Coelho, 2009, revisto por Rosa, 2009
Brasil (São Paulo)	2007-2009, a	Sangue	70	4,2%	IFI, ELISA	11 animais errantes, 10 co-habitavam com ratos	<i>L. chagasi</i>	Coelho <i>et al.</i> , 2011
Brasil (São Paulo)	2008-2009, a	PAAF (medula óssea, linfonodos, baço, fígado), pele	55	49,1%	Exame citológico, IFI, ELISA, imuno-histoquímica, PCR-RT	Animais errantes	<i>L. chagasi</i>	Vides <i>et al.</i> , 2011
Brasil (Rio de Janeiro)	2009, a	-	43	2,4%	IFI, ELISA	-	-	Figueiredo <i>et al.</i> , 2009 citados por Coelho <i>et al.</i> , 2011
Brasil (São Paulo)	2010, a	Tecidos (linfonodo poplíteo, medula óssea, baço)	52	5,76%	Exame citológico, PCR	-	<i>L. chagasi</i>	Coelho <i>et al.</i> , 2010a
Brasil (São Paulo)	2010, b	Sangue, tecidos (linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele)	1		Exame citológico, IFI, ELISA (Proteína A), PCR	-	<i>L. chagasi</i>	Coelho <i>et al.</i> , 2010b
Brasil (São Paulo)	2010, a	Sangue	113	11,5%	ELISA	-	<i>Leishmania sp.</i>	Neto <i>et al.</i> , 2010
Brasil (São Paulo)	2010, a	-	283	0,7%	IFI	-	-	Bresciani <i>et al.</i> , 2010 citados por Coelho <i>et al.</i> , 2011
Brasil (Minas Gerais)	2010, b	Sangue, PAAF medula óssea, tecidos (fígado, baço, rim, pele, linfonodo poplíteo, coração)	1		IFI, PCR, xenodiagnóstico	-	<i>L. infantum</i>	Silva <i>et al.</i> , 2010

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Brasil (Mato Grosso)	2011, b	Sangue	1 ³		PCR-RFLP	Jardim Zoológico	<i>L. chagasi</i>	Dahroug <i>et al.</i> , 2011
Brasil (São Paulo)	2011, a	Sangue, PAAF medula óssea e linfonodos	302	21,85%	Exame citológico, ELISA, IFI	Animais errantes	<i>L. chagasi</i>	Sobrinho <i>et al.</i> , 2012
Egipto	-	-	-	-	-	-	<i>L. major</i>	Morsy & Abou el Seoud, 1994, citado por Rüfenacht, Sager, Müller, 2005
Espanha	1932, b	-	1		-	-	-	Ondovilla, 1932, revisto por Rosa, 2009
Espanha	1999, b	-	2		Serologia, microscopia óptica e electrónica	-	-	Hervás <i>et al.</i> , 1999
Espanha	2000, a	-	117	1,7%	ELISA	-	-	Portus <i>et al.</i> , 2002, citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
Espanha	2001, b	Olho	1		Exame histopatológico	-	-	Hervás <i>et al.</i> , 2001, revisto por Rosa, 2009
Espanha	2002, b	Olho, medula óssea	1		Exame citológico, exame histopatológico, imunohistoquímica, ELISA, PCR	-	-	Leiva, 2002, revisto por Rosa, 2009
Espanha (Sul)	2003-2004, a	Sangue, PAAF do linfonodo poplíteo, esfregaços cutâneos	183	60%	Exame citológico, Cultura, IFI, PCR-ELISA	-	<i>L. infantum</i>	Martín-Sánchez, J. <i>et al.</i> , 2007
Espanha	2005, b	Sangue, PAAF medula óssea, tecidos (olhos)	1		ELISA, exame citológico, exame histopatológico, imuno-histoquímica, PCR	-	<i>Leishmania sp.</i>	Leiva <i>et al.</i> , 2005
Espanha (Madrid)	2005-2006, a	Sangue	233	1,29%	IFI, PCR	2 dos animais positivos tinham acesso ao exterior	<i>L. infantum</i>	Ayllón <i>et al.</i> , 2008
Espanha (Barcelona)	2006, a	Sangue	100	3%	PCR	-	<i>L. infantum</i>	Tabar <i>et al.</i> , 2008
Espanha (Barcelona)	2004-2007, a	Tecidos (pele, olho, junções mucocutâneas)	2632	0,57%	Exame histopatológico, imuno-histoquímica	-	<i>Leishmania sp.</i>	Navarro <i>et al.</i> , 2010

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Espanha (Madrid)	2005-2008, a	Sangue	680	3,7%	IFI, PCR	141 eram animais errantes	<i>L. infantum</i>	Ayllón <i>et al.</i> , 2011
Espanha (Ibiza)	2008, a	Sangue	105	13,2% (ELISA), 8,7% (PCR)	ELISA, PCR-RT	animais errantes	<i>L. infantum</i>	Sherry <i>et al.</i> , 2010
E.U.A Texas (Sul)	1986, b	-	1		Xenodiagnóstico, cultura	-	<i>L. mexicana</i>	Craig <i>et al.</i> , 1986
E.U.A Texas (Sul)	1990, b	Pele	1		-	-	<i>L. mexicana</i>	Barnes <i>et al.</i> , 1993
E.U.A Texas	2004-2008, b	Pele	8		Exame histológico, PCR		<i>L. mexicana</i>	Trainor <i>et al.</i> , 2010
França	1998, b	-	1		-	-	-	Pennisi, 2002 citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
França	1999, a	-	97	12,4%	Western blot	-	-	
França	2004, b	-	2		-	-	-	Pratlong <i>et al.</i> , 2004 citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
França (Sul)	2005, b	Sangue, Biopsia cutânea, tecidos (baço e linfonodos)	1		ELISA, IFI, Western-blot, cultura, electroforese isoenzimática	com cães; deslocava-se para uma área endeme	<i>L. infantum</i> MON-1	Grevot <i>et al.</i> , 2005
França	2006, b	Sangue	1		Exame citológico, IFI	-	-	Verneuil, 2006, revisto Rosa, 2009
França (Sul)	2012, a	Pele	1		Exame histopatológico	-	-	Pocholle <i>et al.</i> , 2012
Grécia	2009, a	Sangue	284	3,87%	ELISA (IgG)	animais errantes	<i>L. infantum</i>	Diakou <i>et al.</i> , 2009
Irão	2009, a	Sangue, tecidos (fígado, baço, pele)	40	10%	Exame citológico, cultura, PCR, análise isoenzimática	animais errantes	<i>L. infantum</i>	Hatam <i>et al.</i> , 2009
Iraque	1931, b	-	2		PCR	-	<i>L. tropica</i>	Machattie & Mills, 1931, citados por Poli <i>et al.</i> , 2002
Israel	2008, a	Sangue	104	6,7%	ELISA (proteína A)	Maioritaria mente animais errantes	<i>L. infantum</i>	Nasereddin <i>et al.</i> , 2008
Itália	1999, b	-	2		-	-	-	
Itália (Ligúria)	2001, a	Sangue	110	0,9%	IFI	-	<i>L. infantum</i>	Poli <i>et al.</i> , 2002

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Itália	2002, a	-	89	68%	IFI	-	-	Pennisi, 2002 citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
Itália	2002, a	-	158	1,9%	IFI	-	-	Mancianti, 2004
Itália	2002, b	-	2		-	-	-	citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
Itália	2002, b	-	1		-	-	-	
Itália (Abruzzo)	2002-2004, a	Sangue, PAAF de linfonodos	203	16,3%	IFI, PCR	4 sem acesso ao exterior, 6 com acesso ao exterior, 23 errantes	<i>L. infantum</i>	Vita <i>et al.</i> , 2005
Itália	2004, b	-	3		-	-	-	Mancianti, 2004 citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
Itália	2004, b	-	4		-	-	-	Pennisi, 2002 citado por Maroli <i>et al.</i> , 2007
Itália (Abruzzo)	-, a	-	-	12,5%	-	-	-	Boari <i>et al.</i> , 2005, citado por Martín-Sánchez, J., 2007
México	2008-2009, a	Sangue	95	10,5%; 10,5%; 20% para as 3 espécies	ELISA, Western blot	Animais errantes	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i>	Longoni <i>et al.</i> , 2012
Nordeste da Península Ibérica e Ilhas Baleares	2007, a	PAAF de medula óssea, tecido ocular	445	6,29% e 5,25% (ELISA prot. A e Ig-G)	ELISA (proteína A, Ig-G), Western blot	255 animais errantes	<i>L. infantum</i>	Solano-Gallego, 2007
Portugal (Sesimbra)	1994, b	Nódulo cervical e linfonodo poplíteo	1		-	-	-	Costa Durão <i>et al.</i> , 1994, citados por Maia <i>et al.</i> , 2008

Tabela 9 – Compilação dos casos e estudos de leishmaniose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Portugal (Área metropolitana de Lisboa)	2003-2005, a	Sangue	180	0,6%	IFI	animais errantes	<i>L. infantum</i>	Duarte <i>et al.</i> , 2010
Portugal (Lisboa)	2004, a	Sangue	23	30,4%	IFI, PCR	fêmeas errantes	<i>L. infantum</i>	Maia <i>et al.</i> , 2008
Portugal (Vila Franca de Xira)	2005-2006, a	Sangue	75	0%	IFI	25 gatos de um gatil	<i>Leishmania</i> sp.	Faria, 2008
Portugal (Norte)	2004-2008, a	Sangue	316	2,8%	DAT, ELISA	-	<i>L. infantum</i>	Cardoso <i>et al.</i> , 2010
Portugal (Área metropolitana de Lisboa)	2007-2008, a	Sangue	142	1,3%; 20,3%	IFI, PCR	12 animais errantes	<i>L. infantum</i>	Maia <i>et al.</i> , 2010
Portugal (Área metropolitana de Lisboa)	2008-2009, a	Sangue	70	0%	IFI	-	<i>L. infantum</i>	Rosa, 2009
Portugal (Porto)	2009, b	Sangue, medula óssea, tecidos	1		Exame citológico, PCR	-	<i>L. infantum</i>	Marcos <i>et al.</i> , 2009
Portugal (Portimão)	2009, b	Sangue, linfonodo	1		Exame citológico, IFI	-	-	Sanches <i>et al.</i> , 2009, revisto por Rosa, 2009
Portugal (Setúbal)	2011, a	Sangue	50	2%	qPCR	associação protectora	<i>L. infantum</i>	Martins, 2011
Portugal (Lisboa)	2012, a	Sangue periférico, gânglio linfático, fígado, medula óssea, baço	95	6,3% 2,1%	DAT, PCR, PCR-RFLP	-	<i>L. infantum</i>	Carreira, 2012
Suíça	1977, b	Pele	1		Exame citológico, xenodiagnóstico	-	-	Schawwalder 1977, revisto por Rosa, 2009
Suíça	2005, b	Nódulo, PAAF medula óssea	2		Exame histopatológico, PCR, ELISA	História de permanência em Espanha	<i>L. infantum</i>	Rufenacht <i>et al.</i> , 2005
Venezuela	1996, b	Pele	4		Exame citológico, cultura, caracterização isoenzimática, xenodiagnóstico	Acesso ao exterior	<i>L. venezuelensis</i>	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> , 1996, revistos por Rosa, 2009
Vietname	1927, b	-	1		-	-	-	Bergeon, 1927, revisto por Rosa, 2009

Anexo III – Dados de dirofilariose felina registrados na literatura científica.

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica.

Local	Ano e Tipo de registro	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
África do Sul	2000, b	PAAF hepática, sangue	1		Citologia, técnica de coloração com fosfatase alcalina	-	<i>D. repens</i>	Schwan, Miller, Kock & Heerden, 2000
Austrália	1991, a	-	200	1%	ELISA, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Kendall, Collins & Pope, 1991
Brasil	1921, b	-	1		-	-	-	Travassos, 1921 citado por Labarthe <i>et al.</i> , 1997
Brasil (Rio de Janeiro)	1989, b	-	1		Necropsia	-	-	Chagas <i>et al.</i> , 1989 citado por Labarthe <i>et al.</i> , 1997
Brasil (São Paulo)	1992, a	-	12	50%	ELISA, necropsia	-	-	Nunes, 1992 citado por Labarthe <i>et al.</i> , 1997
Brasil (Rio de Janeiro)	1993-1994, a	Sangue, pulmões, coração	125	0,8%	Técnica de Knott modificada, necropsia	-		Labarthe <i>et al.</i> , 1997
Colômbia	1990, b	-	1		ELISA	-	<i>D. immitis</i>	Birchard & Bilbrey, 1990
Coreia do Sul	2001-2003, a	Sangue	155	2,6%	Técnica de Knott modificada, ELISA (kit), PCR	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Liu <i>et al.</i> , 2005
Coreia do Sul	2003, a	-	-	0,5%	-	-	<i>D. immitis</i>	Han, 2003, citado por Liu <i>et al.</i> , 2005
Egito (Cairo)	2011, a	Sangue	174	3,4%	Pesquisa de antígenos	-	<i>D. immitis</i>	Al-Kappany <i>et al.</i> , 2011
Espanha (Gran Canaria)	2011, a	Sangue	109	33%	ELISA	-	<i>D. immitis</i>	Montoya-Alonso <i>et al.</i> , 2011
E.U.A.	1922, b	-	1		-	-	-	Riley, 1922 citado por Labarthe <i>et al.</i> , 1997
E.UA. (Tennessee)	1985-1990, a	Sangue	95; 122	4,35%, 9,47%; 0%, 0,82%	Técnica de Knott, kit ELISA	122 animais errantes	<i>D. immitis</i>	Patton, S. & McCracken, 1991

Legenda: a – Rastreamento epidemiológico; b – Relato de caso; – “ ausência de informação; 1 – *Felis nigripes*, 2- *Panthera pardus*.

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
E.U.A (Alabama)	1988, a	-	17	2,8%	ELISA	Animais errantes	<i>D.immitis</i>	Willard, Roberts, Allison, Grieve & Escher, 1988
E.U.A (Florida)	1989, a	-	-	3,1%	-	-	-	Courtney & Qi-Yun, 1989, citados por Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Georgia)	1990, a	-	-	7%	-	-	-	Guerrero <i>et al.</i> , 1992, citado por Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Tennessee)	1991, a	-	-	2,5%	-	-	-	Patton & McCracken, 1991, citados por Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Carolina)	1992, a	-	-	4,3%	-	-	-	Guerrero <i>et al.</i> , 1992, citado por Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Louisiana)	1992, a	-	-	10%	-	-	-	Guerrero <i>et al.</i> , 1992, citado por Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Georgia)	1995, b	Sangue	1		Técnica de Knott modificada, ecocardiografia, serologia	-	<i>D. immitis</i>	Glaus <i>et al.</i> , 1995
E.U.A	1998, a	Sangue	100	9%	Hemograma, técnica de Knott modificada, ELISA, radiologia, ecocardiografia, necropsia	Gatos domésticos com sinais cardio-respiratórios	-	Atkins, De Francesco, Miller, Meurs & Keene, 1998
E.U.A	1998, b	-	1 ¹		Necropsia	Alojado ao ar livre	<i>D. immitis</i>	Deem, Heard & La Rock, 1998
E.U.A	1998, a	Sangue	330	5,8%	Necropsia, serologia	-	<i>D. immitis</i>	Snyder <i>et al.</i> , 2000
E.U.A	1998, a	-	2000	12%	-	-	-	Miller <i>et al.</i> , 1998, citados por Kramer & Genchi, 2002

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
E.U.A	2000, a	Sangue	239	2,5%	Necropsia, serologia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Hermesmeyer, Limberg-Child, Murphy & Mansfield, 2000
E.U.A	2000, a	Sangue	1348	1,9%	Kit ELISA (antigénio)	-	<i>D. immitis</i>	Kalkstein, Kaiser & Kaneene, 2000
E.U.A (Georgia)	2001-2002, a	Sangue, coração, tecido pulmonar	186	2,1%	Necropsia, serologia (pesquisa de anti-corpos e antígenos)	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Carleton & Tolbert, 2004
E.U.A (Costa do Golfo)	2005, a	Sangue	50	8%	Deteção de antigénio (kit comercial)	Depois do furacão Katrina	<i>D. immitis</i>	Levy <i>et al.</i> , 2011
França (Sommieres)	1991, b	urina	1		Observação de microfírias na urina	-	<i>D. immitis</i>	Beaufils <i>et al.</i> , 1991, citados por Morchón <i>et al.</i> , 2012
França (Camargue)	2003, b	-	1		-	Lesões cutâneas	<i>D. repens</i>	Tarello, 2003, citado por Tarello, 2011
Granada	2010, a	Sangue	137	8%, 5,1%	Elisa (deteção de anti-corpos e antigénio)	-	<i>D. immitis</i>	Fernandez <i>et al.</i> , 2010
Itália	1992, a	-	-	23%	-	-	-	Genchi <i>et al.</i> , 1992, citados por Carleton & Tolbert, 2004
Itália	1997, a	Sangue	54	22%	Radiologia, ecocardiografia, técnica modificada de Knott, ELISA, western blot	-	<i>D. immitis</i>	Prieto <i>et al.</i> , 1997
Itália	2000, a	-	31	61,2%	-	Lesões dérmicas	<i>D. repens</i>	Tarello, 2002, citado por Tarello, 2011
Itália	2002, a	Sangue	1045	16%	Técnica de Knott modificada, Kit de deteção de anti-corpos e antigénio	-	<i>D. immitis</i>	Kramer & Genchi, 2002
Itália	2003, b	-	2		-	-	-	Cornegiani, Vercelli, Bo & Colombo, 2003
Itália	2003, b	-	1		-	Oriundo de França	<i>D. repens</i>	Tarello, 2003, citado por Tarello 2011
Itália	2006, a	Sangue	212	4,7%	Serologia (pesquisa de anticorpos)	-	<i>D. immitis</i>	Venco <i>et al.</i> , 2011

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Itália (Abruzzo)	2008-2009, a	Sangue	300	0,3% 1,6%	Pesquisa de antígenos (kit comercial), técnica de Knott e PCR	150 animais de gatis	<i>D. immitis</i> <i>D. repens</i>	Traversa <i>et al.</i> , 2010 a
Itália	2009, b	Sangue, coração	1		Necropsia, kit de detecção de antígeno, PCR	No exterior	<i>D. immitis</i>	Mazzariol <i>et al.</i> , 2010
Itália	2010, b	-	1 ²		-	-	<i>D. immitis</i>	Mazzariol <i>et al.</i> , 2010, citados por Morchón <i>et al.</i> , 2012
Itália	2010, b	-	5		Técnica de Knott modificada, serologia para detecção de antígenos de <i>D. immitis</i> , PCR	-	<i>D. repens</i>	Traversa <i>et al.</i> , 2010, citados por Tarello, 2011
Japão (Tóquio)	1932, b	-	1		Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Itagaki & Kume, 1938, citados por Roncalli, Yamane & Nagata, 1998
Japão (Fukuoka/Kumamoto)	1959, a	-	52	5,8%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Okabe & Oba, 1959, citados por Roncalli, Yamane & Nagata, 1998
Japão (Fukuoka)	1959, a	-	15	6,7%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Ikuyama, 1960, citado por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Kyoto)	1965, a	Órgãos internos	307	0,6%	-	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Takayama <i>et al.</i> , 1965, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Shiga)	1965-1966, a	-	83	1,2%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Kondo <i>et al.</i> , 1969, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Tóquio)	1969, a	-	121	2,5%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 1971 citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Tóquio)	1973, a	coração	62	6,4%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Oishi <i>et al.</i> , 1973 citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Osaka)	1973, a	coração	100	7%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Iseki <i>et al.</i> , 1974, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Japão (Osaka)	1974, a	-	198	2,5%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Takada <i>et al.</i> , 1976, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Tóquio)	1972-1975, a	coração	305	9,5%	Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Mutoh <i>et al.</i> , 1976, citado por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1974, b	-	3		Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Nomura <i>et al.</i> , 1974, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Kanto)	1973-1974, a	-	91 80	3,29% 0%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Fujinami <i>et al.</i> , 1983, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1980, b	-	1		Radiologia, necropsia	-	<i>D.immitis</i>	Okamoto & Akano, 1980, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Saitama)	1982, a	-	106	1,9%	Necropsia	Animais errantes	<i>D.immitis</i>	Saito <i>et al.</i> , 1983, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Azabu)	1981-1982, a	coração	53	1,9%	Necropsia	-	<i>D.immitis</i>	Fukase <i>et al.</i> , 1984, ciado spor Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Hyogo)	1982-1983, a	-	1024	2,3%	Necropsia	Animais errantes	<i>D. immitis</i>	Gotoh <i>et al.</i> , 1984, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1984, b	-	1		Radiologia, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Horioka <i>et al.</i> , 1984, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Kanto)	1982-1984, 2	-	151	2%	Necropsia	Aniamais errantes	<i>D. immitis</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 1985, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Tottori)	1983-1986, a	coração	100	3%	Necropsia	Gatos domésticos doentes	<i>D. immitis</i>	Yamane <i>et al.</i> , 1986, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1986, b	-	2		Radiologia, ecocardiograma	-	<i>D. immitis</i>	Takehashi <i>et al.</i> , 1986, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Japão (Aomori)	1982-1988, a	-	200	0,5%	Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Shimomura <i>et al.</i> , 1990, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1986, b	-	1		Radiologia, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Amimoto, 1986, citado por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1986, b	-	1		Radiologia, toracocentese, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Fuyama <i>et al.</i> , 1986, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1986, b	-	2		Radiologia, ecocardiografia	-	<i>D. immitis</i>	Takehashi <i>et al.</i> , 1986, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1986, b	-	1		Radiologia, ecocardiografia, necropsia		<i>D. immitis</i>	Nakanishi <i>et al.</i> , citado por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1987, b	-	1		Microfilaremia	-	<i>D. immitis</i>	Kusachi, 1987, citado por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Osaka)	1987-1989, a	-	58	5,2%	Necropsia	Gatos domésticos	<i>D. immitis</i>	Nishida and Awazu, 1994, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1991, b	-	1		Radiologia, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Machida <i>et al.</i> , 1991, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1992, b	-	1		Radiologia, ecocardiograma, necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 1992, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Kanto)	1992-1993, a	-	206	2,4%	Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Fukase <i>et al.</i> , 1994, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Saitama)	1989-1995, a	-	363	4,1%	-	-	<i>D. immitis</i>	Kurata <i>et al.</i> , 1995, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão (Saitama)	1989-1995, a	-	1840	0,8%	Necropsia	-	<i>D. immitis</i>	Nogami & Sato, 1997

Tabela 10 – Compilação dos casos e estudos de dirofilariose felina relatados na literatura científica (continuação).

Local	Ano e Tipo de registo	Amostra	N.º de gatos examinados	Prevalência	Método	Observações	Espécie Identificada	Autores
Japão	1995, b	-	1		Radiologia	-	<i>D. immitis</i>	Narita <i>et al.</i> , 1995, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Japão	1995, b	-	1		Radiologia, serologia	-	<i>D. immitis</i>	Narita <i>et al.</i> , 1995, citados por Roncalli <i>et al.</i> , 1998
Portugal (Área Metropolitana de Lisboa)	2009, a	Sangue	70	1,43%	Pesquisa de microfilária, técnica de Knott modificada, pesquisa de antígenos (kit comercial)		<i>D. immitis</i>	Rosa, 2009
Portugal (Setúbal)	2010, a	Sangue	86	1,2%	Pesquisa de antígenos (kit comercial)	-	<i>D. immitis</i>	Almeida, 2010
Portugal (Norte e Centro)	2011, a	-	-	17,51%	Serologia	-	<i>D. immitis</i>	Vieira <i>et al.</i> , 2011, citados por Morchón <i>et al.</i> , 2012
Portugal (Região do Baixo Vouga)	2011, a	Sangue	72	1,4%	Deteção de antígenos, deteção de microfilárias	-	<i>D. immitis</i>	Miranda, 2011
Tailândia	2002, a	Sangue	52	1,9%	Pesquisa de microfilárias, fosfatase ácida, PCR-RFLP		<i>D. immitis</i>	Nuchprayoon <i>et al.</i> , 2006
Tailândia (Bangkok)	2009, a	Sangue	746	4,6%	Kit ELISA (deteção antígenos)	-	<i>D. immitis</i>	Sukhumavasi <i>et al.</i> , 2012
Ucrânia (Kiev)	2004, b	-	1		-	-	<i>D. repens</i>	Mazurkevich <i>et al.</i> , 2004, citados por Tarello <i>et al.</i> , 2011

Anexo IV – Termo de responsabilidade e certificado de autorização dos proprietários dos animais testados para a infecção por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis*.

**Termo de Responsabilidade e Certificado de Autorização de participação no projecto
“The role of domestic cats in the epidemiology of zoonotic leishmaniasis”**

Eu, _____, proprietário/a do felino
“_____”, autorizo a sua participação no Projecto “The role of domestic cats in the epidemiology of zoonotic leishmaniasis”, nomeadamente, a colheita de sangue periférico pelo médico veterinário e a utilização dos dados referentes ao meu animal, atestando ter sido informado/a das condições do mesmo.

____ de _____ de _____

(assinatura do proprietário)

Anexo V – Ficha de Identificação dos animais testados para as infeções por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis* e Inquérito apresentado aos proprietários.

Ficha de Identificação - Colheita de sangue Periférico



Identificação do Proprietário

Nome: _____

Contacto: _____

Identificação do animal

Data colheita _____

Nome: _____

Data nasc. (ou idade aprox.): _____

Sexo: M ☐

F ☐

Inteiro ☐

Castrado ☐

Raça: _____

Pelagem: Curta ☐

Média ☐

Comprida ☐

Freguesia onde vive o animal: _____

Concelho onde vive o animal: _____

O animal permanece: Exclusivamente dentro de casa

A maior parte do tempo dentro de casa

Igualmente dentro e fora de casa

A maior parte do tempo fora de casa

Exclusivamente fora de casa

O animal convive com **outros animais**? Não ☐

Sim ☐

Qual? _____

Deslocações em Portugal ou fora do País?

Não ☐

Sim ☐

Onde? _____

O animal recebe regularmente **insecticidas/repelentes**?

Não ☐ Sim ☐ Qual? _____

O animal é **desparasitado** regularmente?

Não ☐ Sim ☐ Qual? _____

O animal é **vacinado** regularmente?

Não	<input type="checkbox"/>	
Sim	<input type="checkbox"/>	Rinotraqueíte <input type="checkbox"/>
		Panleucopénia <input type="checkbox"/>
		Calicivirose <input type="checkbox"/>
		Clamidiose <input type="checkbox"/>
		Leucose felina <input type="checkbox"/>
		Raiva <input type="checkbox"/>

Se clinicamente suspeito, por favor indique os **sinais clínicos** presentes:

Lesões dérmicas (alopécia e/ou seborreia e/ou ulcerações) ☐

Linfadenopatia	<input type="checkbox"/>	Lesões oculares	<input type="checkbox"/>
Perda de peso progressivo	<input type="checkbox"/>	Epistáxis	<input type="checkbox"/>
Atrofia muscular	<input type="checkbox"/>	Onicogribose	<input type="checkbox"/>
Diminuição do apetite	<input type="checkbox"/>	Palidez das mucosas	<input type="checkbox"/>
Febre	<input type="checkbox"/>	Poliúria e Polidipsia	<input type="checkbox"/>
Letargia	<input type="checkbox"/>	Vômito e/ou Diarreia	<input type="checkbox"/>
Intolerância ao exercício	<input type="checkbox"/>	Claudicação	<input type="checkbox"/>

Doenças concomitantes:

Não ☐

Sim ☐

Qual? _____

Produto a analisar:

soro ☐

sangue em pap. filtro ☐

gânglio ☐

medula óssea ☐

outro _____

Colheita efectuada por

Anexo VI – Procedimento seguido na obtenção de amostras para pesquisa de *Leishmania* spp. e *D.immtis*.

1- Colheita de sangue periférico de gatos:

1. Colher 2-3 ml de sangue por animal;
2. Colocar uma gota de sangue do tamanho de uma moeda de 2€ no papel de filtro. Identificar o papel com o nome do animal, ou no caso de se tratar de um animal errante, seguir uma identificação seriada, e a data da colheita. (deixar secar antes de guardar no saco);
3. Verter o restante sangue para um tubo seco e proceder, igualmente, à sua identificação;
4. Separar o soro por centrifugação (18 g – 24 g, 10 min, temperatura ambiente);
5. Colocar o soro em alíquotas e conservar a -20.ºC até testagem.

Anexo VII - Testes de Diagnóstico realizados e Procedimentos/ Protocolos Laboratoriais efectuados no Rastreio de infecção por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis*.

1. Testes para detecção de *L. infantum*

1.1. Técnicas serológicas

1.1.1. “DAT” – Teste de Aglutinação Directa

Este teste permite proceder à pesquisa de anticorpos de anti-*Leishmania*, tendo sido usadas neste trabalho amostras de soro, os reagentes indicados e o protocolo sugerido pelo fabricante do antigénio (freeze dried *Leishmania donovani* 1S promastigotes) – KIT® Biomedical Research:

A. Execução do teste com amostras de soro

Material:

- Micropipetas (P10 e multicanal 50-200µl) e pontas
- Placas de micro-titulação com fundo cónico (DeltaLab, Espanha)
- Amostras de soro
- Amostra de soro com anticorpos anti- *L.infantum* (controlo positivo)
- Luvas

Reagentes:

- Antigénio liofilizado de *Leishmania* (densidade parasitária de 5×10^7 /ml) (KIT®)
- Solução Salina (NaCl 0,9%)
- Solução de Diluição (NaCl 0,9%, β-mercaptoetanol 0,78% (SIGMA®))

Protocolo:

Preparação dos reagentes:

1. Adicionar 5 ml de solução salina 0,9% ao frasco com o antigénio e deixar à temperatura ambiente pelo menos 5 min. Antes de utilizar, misturar gentilmente, sem agitar.
2. Preparar o fluido de diluição, adicionando 780 µl de β-mercaptoetanol 0,1M a 100 ml de solução salina NaCl 0,9%.

Execução do teste:

1. Preencher os poços da placa de micro-titulação com o fluido de diluição. Colocar na primeira coluna 100 µl do fluido e nas restantes 50 µl;
2. Adicionar 1µl de soro a cada poço da primeira coluna de diluição;
3. Proceder às diluições do soro com a utilização de uma pipeta multicanal, da seguinte forma: misturar o conteúdo dos poços da primeira coluna de diluição

e retirar 50 µl para os poços da segunda coluna de diluição; misturar novamente, e transferir mais 50 µl de soro diluído para a coluna seguinte; proceder de igual modo até se obter a diluição final pretendida, desprezando os 50 µl recolhidos dessa coluna (devem ser reservados alguns poços para um controlo positivo e um controlo negativo, efectuando para o controlo positivo, exactamente as mesmas diluições);

4. Adicionar, de seguida, 50 µl de antigénio a cada poço;
5. Por fim, tocar levemente em cada um dos lados da placa para que o conteúdo dos poços se misture;
6. Deixar as placas à temperatura ambiente durante, aproximadamente, 18 horas;
7. Proceder à leitura das placas sobre uma superfície clara. O título a designar corresponderá à última diluição em que ainda se observa uma clara aglutinação.

1.2. Técnicas moleculares

1.2.1. “PCR” – Reacção em Cadeia da Polimerase

Esta técnica permite pesquisar a presença de uma sequência específica de ADN do parasita. Neste caso foram utilizadas amostras de sangue periférico em papel de filtro e uma adaptação dos procedimentos sugeridos pelos fabricantes dos testes escolhidos.

A. Extracção de ADN a partir de papel de filtro impregnado usado o Kit Citogene®

Material:

- Micropipetas (P10, P200, P1000) e pontas com filtro
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Furador
- Pinça
- Luvas
- Banho-maria/Placa térmica
- Microcentrífuga
- Vortex
- Amostras de sangue em papel de filtro

Reagentes:

- Cell Lysis (Citomed®)
- Proteinase K (20 mg/ml) (Bioline ®)
- Protein Precipitation (Citomed®)

- Isopropanol 100% (SIGMA®)
- Etanol 70% (Panreac ®)
- DNA Hydratation (Citomed®)

Protocolo (adaptado):

- 1- Com um furador tirar 2 a 3 “confettis” do papel de filtro impregnado com sangue periférico e, com o auxílio de uma pinça, coloca-los num eppendorf; (não tocar nos papéis sem luvas)
- 2- Adicionar 150 µl de Cell Lysis e 1,5 µl de Proteinase K;
- 3- Agitar manualmente, e verificar que os “confettis” ficam imersos no líquido;
- 4- Incubar em banho-maria/placa térmica a 65°C durante 15 min;
- 5- Incubar novamente, a 55°C durante 2 horas, invertendo os tubos periodicamente durante a incubação (Preparar tubos para o passo 9, ou seja, adicionar o Isopropanol e identificar a amostra);
- 6- Retirar os eppendorf do banho-maria/ placa térmica, deixando arrefecer o lisado à temperatura ambiente;
- 7- Retirar os “confettis” dos eppendorf com a ajuda de uma ponta e adicionar 100 µl da solução Protein Precipitation;
- 8- Agitar no vortex a velocidade elevada durante 20seg (para misturar uniformemente a solução);
- 9- Centrifugar a 84 g, durante 15 min, a 4°C para que se forme um pellet compacto de proteína. Repetir este passo caso o pellet não seja visível;
- 10- Pipetar o sobrenadante (cerca de 200 µl) para um novo eppendorf contendo 300 µl de Isopropanol a 100%;
- 11- Misturar por inversão 50 vezes;
- 12- Centrifugar a 84 g, 5 min, a 4°C;
- 13- Dispensar o sobrenadante e escorrer com cuidado o tubo para um papel absorvente;
- 14- Adicionar 300 µl de etanol a 70% e inverter o tubo suavemente várias vezes para garantir a lavagem do pellet de ADN;
- 15- Centrifugar a 84 g, 1min, a 4°C;
- 16- Rejeitar o sobrenadante (etanol) com cuidado, pois o pellet pode estar solto, e colocar o tubo aberto, em posição invertida, sobre papel absorvente, na estufa a 52°C até que todo o líquido seque completamente;
- 17- Adicionar 30 µl de DNA Hydratation a cada tubo;
- 18- Incubar as amostras durante a noite à temperatura ambiente;
- 19- Armazenar o ADN a -20°C até realização da PCR.

B. Controlo de Extracção de ADN – Amplificação de β -actina Felina

Material:

- Micropipetas (P10, P100 e P200) e pontas com filtro
- Tubos eppendorf de 1,5 ml e tubos de PCR de 0,2 ml
- Vortex
- Termociclador (Thermo Electron Corporation® Px2 Thermal Cycler)
- Amostras de ADN
- Controlo positivo (ADN extraído a partir de um órgão felino)
- Luvas

Reagentes:

- Tampão de reacção [tampão NH_4 (5X): 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)] (Bioline®)
- Solução de Mg^{2+} (25 mM MgCl_2) (Bioline®)
- dNTPs (10 mM) (Bioline®)
- Primers Bet Fel1 e Bet Fel2 (10 pmol/ μl) (Bioline®)

Bet Fel1: 5'CCATTTTCTGTTCCGCCTTA3'

Bet Fel2: 5'CAACGGGCTCCTTAGTCAGA3'

- Polimerase de ADN Taq (5U/ μl) (Promega®)
- Água ultrapura (H_2O mQ) (Labesfal®)

Protocolo:

Preparação da mistura de reacção – “mix”:

1. Identificar os tubos de 0,2 ml para as diferentes amostras, incluindo o controlo positivo e negativo;
2. Adicionar os seguintes reagentes, pela respectiva ordem, num eppendorf de 1,5 ml:

Tabela 11 – Constituição da mix para a PCR de β -actina Felina, concentrações e volumes.

Mix	Concentração na “mix”	Mix / amostra (μl)
Água ultrapura		12,3 μl
Tampão de reacção 5X	1x	5 μl
MgCl_2	2 mM	2 μl
dNTPs	0,2 mM	0,5 μl
Primer 5'	10 pmol	1 μl
Primer 3'	10 pmol	1 μl
Taq Polimerase	1 U	0,2 μl
Total		22 μl

3. Colocar 22 µl de mix em cada tubo de PCR;
4. Adicionar 3 µl das amostras de ADN a cada tubo (no tubo do controlo positivo adicionar 1-3 µl de ADN do controlo positivo, no tubo do controlo negativo adicionar 3 µl de água ultrapura);
5. Colocar os tubos no termociclador e seguir as seguintes etapas da PCR:

Tabela 12 – Etapas da PCR de β -actina Felina.

Etapa	Temperatura	Tempo	} 35 ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5min	
Desnaturação	95°C	30seg	
Ligação dos Primers	56°C	30seg	
Extensão	72°C	30seg	
Extensão final	72°C	5min	

O produto de amplificação possui 229 pb.

C. Amplificação de ADN cinetoplastideal (kDNA) de *Leishmania*

Material:

- Micropipetas (P10, P100 e P200) e pontas com filtro
- Tubos eppendorf de 1,5 ml e tubos de PCR de 0,2 ml
- Vortex
- Termociclador (Thermo Electron Corporation® Px2 Thermal Cycler)
- Amostras de ADN
- Controlo positivo (ADN extraído a partir de papel de filtro, de uma cultura de massa de promastigotas de *L. infantum*)
- Luvas

Reagentes:

- Tampão de reacção [tampão NH_4 (5X): 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)] (Bioline®)
- Solução de Mg^{2+} (25 mM MgCl_2) (Bioline®)
- dNTPs (10 mM) (Bioline®)
- Primers MC1 e MC2 (5 pmol/µl) (Bioline®)

MC1: 5'GTTAGCCGATGGTGGTCTTG3'

MC2: 5'CACCCATTTTCCGATTTTG 3'

- Polimerase de ADN Taq (5U/µl) (Promega®)
- Água ultrapura (H_2O mQ) (Labesfal®)

Protocolo:

Preparação da mistura de reacção – “mix”:

1. Identificar os tubos de 0,2 ml para as diferentes amostras, incluindo o controlo positivo e negativo;
2. Adicionar os seguintes reagentes, pela respectiva ordem, num eppendorf de 1,5 ml:

Tabela 13 – Constituição da mix para a PCR de *Leishmania*, concentrações e volumes.

Mix	Concentração na “mix”	Mix / amostra (µl)
Água ultrapura		5,3 µl
Tampão de reacção 5X	1x	5 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
dNTPs	0,2 mM	0,5 µl
Primer 5’	15 pmol	3 µl
Primer 3’	15 pmol	3 µl
Taq Polimerase	1 U	0,2 µl
Total		20 µl

3. Colocar 20 µl de mix em cada tubo de PCR;
4. Adicionar 5 µl das amostras de ADN a cada tubo (no tubo do controlo positivo adicionar 2 µl de ADN do controlo positivo e 3 µl de água ultrapura, no tubo do controlo negativo adicionar 5 µl de água ultrapura);
5. Colocar os tubos no termociclador e aguardar pela sequência de etapas da PCR:

Tabela 14 – Etapas da PCR de *Leishmania*.

Etapa	Temperatura	Tempo	} 30 ciclos
Desnaturação inicial	94°C	2min	
Desnaturação	94°C	20seg	
Ligação dos Primers	60°C	20seg	
Extensão	72°C	30seg	
Extensão final	72°C	5min	

O produto de amplificação apresenta 447 pb.

D. Preparação do gel de agarose e electroforese dos produtos de PCR

Material:

- Micropipeta P10 e pontas
- Balão “Erlenmeyer”
- Balança
- Equipamento de electroforese
- Produtos de PCR
- Luvas

Reagentes:

- Agarose (Invitrogen™)
- Brometo de etídio (0,5 µg/ml)
- Tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8,3) (Bio-Rad®)
- Corante Orange G (5X)
- Marcador 100pb

Protocolo:

Preparação do gel de agarose 1,5 %:

1. Pesar 2,25 g de agarose e adicionar 150 ml de tampão TAE 1X, num balão “Erlenmeyer”;
2. Colocar no microondas (aproximadamente 3 minutos) até que a agarose se apresente completamente transparente;
3. Arrefecer um pouco a agarose e posteriormente adicionar 7,5 µl (0,02µg/ml) de brometo de etídio;
4. Colocar a agarose no suporte do gel, já com o pente colocado;
5. Aguardar aproximadamente 15-30 minutos, para que o gel polimerize.

Aplicação das amostras no gel:

1. Depois do gel polimerizar, colocar o suporte na tina de electroforese, tendo o cuidado do gel ficar completamente submerso pelo tampão de electroforese (tampão TAE 1X);
2. Retirar as amostras do frigorífico (4°C) e adicionar a cada uma 5 µl de corante Orange G;
3. Aplicar no primeiro poço 5 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de bases;

4. Nos poços seguintes aplicar 10 µl de cada amostra resultante do produto de PCR;
5. Por fim, aplicar o controlo negativo e o mesmo volume do controlo positivo;
6. Iniciar a electroforese com 120 volts e 400 mA durante 60 minutos.

E. Visualização dos produtos de PCR

Material:

- Transiluminador e fotocamera (UVIDDOC)
- Gel carregado
- Luvas

Protocolo:

1. Após a electroforese, retirar o gel da tina e observar no transiluminador e fotografar no sistema UVIDOC.

1.2.2. PCR-RFLP – Restrição enzimática dos produtos da PCR

Material:

- Micropipetas (P10, P100 e P200) e pontas com filtro
- Tubos eppendorf de 1,5 ml e tubos de PCR de 0,2 ml
- Vortex
- Produtos de PCR
- Luvas

Reagentes:

- Água ultrapura (H₂O mQ) (Labesfal®)
- Tampões
- Enzimas

Protocolo:

1. Certificar que os produtos de PCR não têm bandas inespecíficas e que a banda de amplificação tem bom sinal;
2. Seleccionar o tampão apropriado para cada enzima de acordo:
 - *Bgl*II (Roche®):M
 - *Bme*1390I = *Scr*FI (Roche®):B
 - *Dde*I (Biolabs®):3
 - *Hpa*II (Fermentas®):Y+/Tango

- *Rsa*I (Promega®):C
- *Vsp*I (Fermentas®):O⁺

3. Preparar as mixes para cada enzima de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 13 – Constituição da mix para cada enzima, concentrações e volumes.

Mix	Concentração na “mix”	Mix / amostra (μl)
Água ultrapura		
Tampão (específico para cada enzima)	1x	2 μl
Enzima	10-16 U	1,6 μl
Produtos de PCR		6-10 μl
Total		20 μl

- Vortexar as mixes e distribuir pelos tubos de 0,2 ml (preparar também um controlo negativo de restrição com água ultrapura em substituição do produto de PCR);
- Adicionar o produto de PCR com uma micropipeta diferente da usada para o ADN na reacção de PCR;
- Certificar que a solução fica toda no fundo;
- Colocar os tubos de 0,2 ml num suporte de borracha e incubar em banho-maria a +37°C durante 3 horas;
- Retirar os tubos e colocá-los a +4°C até posterior utilização;
- Preparar um gel de agarose de 3%;
- Diluir 10 μl do produto de restrição com 2 μl do corante Orange G;
- Carregar o gel. Colocar um marcador de massa molecular de 50 pares de base (GEHealth®). Aplicar uma corrente eléctrica de cerca de 110V durante cerca de 150 minutos;
- Visualizar o gel e fotografar;
- Fazer a análise das bandas de acordo com o seguinte quadro:

Quadro 11. Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease.

Endonucleases	<i>Bgl</i> II			<i>Bme</i> 1390 I			<i>Dde</i> I			<i>Hpa</i> II				<i>Rsa</i> I			<i>Vsp</i> I			<i>Pst</i> I	<i>Sfc</i> I	<i>Xap</i> I
Padrões	I	II		I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	I	II	III	I	I	I
	447	258		411	288	447	319	419	240	410	287	447	350	253	210	253	160	170	310	298	224	347
Fragmentos de restrição (pb)		189		36	123		100	28	179	37	123		60	194	197	146	150	137	137	149	153	60
					36			28	28		37		37		40	48	137	90			70	40

pb, pares de bases.

2. Testes para detecção de *D. immitis*

1.1 - Técnica serológica

1.1.1 “SNAP® Feline Triple ® Test”

Este teste permite proceder à pesquisa de antígenos de *D. immitis* e do FeLV e anticorpos anti-FIV, utilizando amostras de sangue total ou soro e seguindo as instruções do fabricante do teste.

Material:

- Placa de teste (contem 0,4 ml de solução de lavagem e 0,6 ml de solução de substrato) (IDEXX ®)
- Pipeta Pasteur
- Tubos
- Vortex
- Amostras de soro
- Luvas

Reagentes:

- Conjugado (anti-Dirofilaria, anti-FeLV e FIV:HRPO) (IDEXX ®)

Protocolo:

1. Colocar a placa de teste e o conjugado à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos (Não aquecer!);
2. Verter 3 gotas de soro num tubo fornecido com o teste;
3. Adicionar 4 gotas da solução tampão, mantendo o tubo sempre na posição vertical;
4. Fechar cuidadosamente o tubo e agitar lentamente, invertendo-o 3 a 5 vezes;
5. Colocar a placa de teste sobre uma superfície plana e horizontal. Verter todo o conteúdo do tubo no poço da amostra, tendo o cuidado de não derramar.
6. A amostra fluirá até à janela de resultados, alcançando o círculo de activação em aproximadamente 30-60 segundos;
7. Assim que aparecer cor no círculo de activação, pressionar o activador com firmeza;
8. Analisar os resultados passados 10 minutos.